



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA CRIPTOSPORIDIOSE EM VITELOS DE
EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA TERCEIRA, AÇORES

SÍLVIA VANESSA ANTUNES DE BARROS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

ORIENTADOR

Dra. Isilda Cristina Gomes Flor

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA CRIPTOSPORIDIOSE EM VITELOS DE
EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA TERCEIRA, AÇORES

SÍLVIA VANESSA ANTUNES DE BARROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

ORIENTADOR

Dra. Isilda Cristina Gomes Flor

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2015

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Isilda Flor, pela orientação, transmissão de conhecimentos, disponibilidade e confiança depositada em mim na execução deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pela orientação e disponibilidade, mas também pela sua amizade e boa disposição diárias que fazem com que seja muito agradável trabalhar sob sua supervisão.

Ao director de Serviços da Direcção de Serviços de Veterinária, Dr. Hernâni Martins e à directora do Laboratório Regional de Veterinária, Dra. Lúdia Flor pela autorização concedida para a realização do estágio no Laboratório Regional de Veterinária.

Ao Dr. Vielmínio Ventura, pela disponibilidade demonstrada e ajuda preciosa na colheita das amostras.

Ao Dr. Telmo Nunes da FMV-ULisboa, pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

A todos os proprietários de explorações de bovinos da ilha Terceira que autorizaram a colheita de amostras nos seus animais e proporcionaram a realização deste trabalho.

À Sra. Rosa Armas, assistente técnica do sector de Parasitologia do Laboratório Regional de Veterinária, pelo acolhimento no seu sector, disponibilidade e transmissão de conhecimentos durante o período de estágio.

À minha amiga Alda do Laboratório Regional de Veterinária, pela preciosa ajuda, amizade e dedicação.

À Soninha, Filipe e Natacha que sempre me apoiaram e motivaram neste percurso desde o primeiro dia.

Ao Gonçalo Antunes que sempre esteve ao meu lado e tem a paciência de me aturar, mesmo nas horas menos boas.

E porque os últimos são os primeiros, aos meus pais e restante família que tornaram possível a concretização deste sonho, a vocês um obrigado muito especial!

Bem Hajam!

Contribuição para o estudo da Criptosporidiose em vitelos de explorações leiteiras da ilha Terceira, Açores

RESUMO

Os protozoários do género *Cryptosporidium* são parasitas obrigatórios, sendo algumas espécies responsáveis por diarreias em vitelos. O impacto da criptosporidiose nas explorações leiteiras fica a dever-se sobretudo às perdas económicas provocadas pela doença clínica, nomeadamente os gastos directos em tratamentos veterinários e os gastos indirectos devido a mortalidades e atrasos no crescimento. O contágio é efectuado por via fecal-oral e a transmissão pode ocorrer de forma directa pelo contacto com fezes de animais infectados, ou de forma indirecta pelo contacto com superfícies contaminadas ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados.

Os objectivos deste estudo foram avaliar a prevalência e os fatores de risco associados ao parasitismo por *Cryptosporidium* sp. em vitelos de explorações leiteiras até aos 60 dias de idade, com e sem diarreia, na ilha Terceira, Açores. As amostras fecais foram colhidas de 250 vitelos provenientes de 51 explorações e analisadas através de esfregaço fecal e coloração de Ziehl-Neelsen modificada. A consistência das fezes foi classificada de forma a avaliar a presença ou ausência de diarreia. Dados das práticas de manejo e condições sanitárias foram obtidos através de questionário ao produtor. A prevalência global da infecção por *Cryptosporidium* sp. foi de 31,2% nos animais examinados e 54,9% das explorações possuíam pelo menos um animal positivo. Os vitelos com idade compreendida entre os 1-7 dias e entre os 8-15 dias apresentaram as maiores prevalências 42,9% e 54,1%, respectivamente. Das fezes diarreicas, 53,5% foram positivas e apenas 16,1% das fezes normais foram positivas. A análise estatística mostrou que existe uma associação significativa ($p < 0,05$) entre a infecção por *Cryptosporidium* sp. e a idade e a presença de diarreia. Nenhuma das variáveis obtidas por questionário demonstrou ter um efeito significativo no desencadear da parasitose ($p > 0,05$). Este estudo sugere fortemente que os vitelos até aos 21 dias de idade são uma importante fonte de infecção e a principal fonte de contaminação ambiental neste sistema de produção leiteira.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* sp.; vitelos; prevalência; risco de infecção; ilha Terceira; Açores; Portugal.

Contribution to the study of cryptosporidiosis in calves of dairy farms from Terceira Island, Azores

ABSTRACT

The protozoans of genus *Cryptosporidium* are obligate parasites, and some species are responsible for diarrhea in calves. The impact of this disease on dairy farms is mainly due to the economic losses caused by clinical disease, including direct costs in veterinary treatment and indirect costs due to mortality and growth retardation. Infection occurs through fecal-oral route and the transmission can arise directly through contact with the feces of infected animals, or indirectly by contact with contaminated surfaces or by water or contaminated food.

The objectives of this study were to evaluate the prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* sp. in calves of dairy farms up to 60 days of age, with and without diarrhea in Terceira Island, Azores. Fecal samples were collected in 250 calves from 51 farms and analyzed by fecal smear and modified Ziehl-Neelsen staining. Faeces consistency was graded to assess the presence or absence of diarrhea. Data of management practices and sanitary conditions were obtained through a questionnaire to the producer. The overall prevalence of infection by *Cryptosporidium* sp. was 31.2% and 54.9% of farms had at least one positive animal. Calves aged between 1-7 days old and between 8-15 days old showed the highest prevalence 42.9% and 54.1%, respectively. Of diarrheal faeces 53.5% were positive and only 16.1% of normal faeces were positive. Statistical analysis showed a significant association ($p < 0.05$) between the infection by *Cryptosporidium* sp. and the animal age and the presence of diarrhea. None of the variables obtained by questionnaire have shown a significant effect on the onset of the parasitosis ($p > 0.05$). This study strongly suggests that the calves until 21 days of age are a major source of infection and a major source of environmental contamination in this dairy production system.

Keywords: *Cryptosporidium* sp.; calves, prevalence; risk of infection; Terceira island; Azores; Portugal.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
 CAPÍTULO I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO	11
1. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO REGIONAL DE VETERINÁRIA DOS AÇORES	11
2. CASUÍSTICA DO SECTOR DE PARASITOLOGIA DO LRVA	12
2.1 Pesquisa de larvas de <i>Trichinella</i> spp.....	12
2.2 Outras pesquisas	13
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
INTRODUÇÃO	19
I. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA CRIPTOSPORIDIOSE	21
1. HISTÓRIA	21
2. TAXONOMIA	21
3. CARACTERÍSTICAS DO GÉNERO <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	24
3.1 Morfologia.....	24
3.2 Bioquímica e metabolismo.....	26
3.3 Resistência e sobrevivência no ambiente	27
3.4 Microbiótomo.....	28
4. CICLO DE VIDA.....	29
4.1 Desenquistamento	30
4.2 Invasão celular.....	30
4.3 Merogonia ou esquizogonia	30
4.4 Gametogonia	31
4.5 Esporogonia.....	31
4.6 Período pré-patente e patente	31
II. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CRIPTOSPORIDIOSE.....	32
1. DISTRIBUIÇÃO.....	32
2. TRANSMISSÃO.....	33
3. HOSPEDEIROS ESPECÍFICOS	34
4. IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA.....	35
III. CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA	37
1. ESPÉCIES QUE AFECTAM OS BOVINOS	37
2. EPIDEMIOLOGIA	38
3. DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA.....	40
4. VIAS DE TRANSMISSÃO	42
A) Transmissão directa.....	42
B) Transmissão indirecta.....	42

5. FACTORES DE RISCO	42
5.1 Idade	42
5.2 Infecções concomitantes	43
5.3 Proximidade a cursos de água	43
5.4 Tamanho do rebanho	43
5.5 Época de partos	43
5.6 Tipo de alojamento	44
5.7 Tipo de piso	45
5.8 Espessura da cama	45
5.9 Lavagem e desinfecção	45
5.10 Separação dos vitelos após o nascimento	46
5.11 Administração de colostro	46
5.12 Administração de leite de substituição	46
6. PATOGENIA E SINAIS CLINICOS	47
7. FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA	49
8. MECANISMOS DE DEFESA CONTRA A INFECÇÃO POR <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	50
8.1 Resposta imunitária inata e adquirida	50
8.2 Resposta humoral	50
8.3 Resposta celular	51
9. DIAGNÓSTICO	51
9.1 Diagnóstico clínico	51
9.2 Diagnóstico laboratorial	52
9.2.1 Exame microscópico	52
9.2.2 Técnicas imunológicas	53
9.2.3 Técnicas moleculares	54
10. TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLO DA CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA ...	55
10.1 Tratamento	55
10.2 Vacinação	57
10.3 Medidas de controlo	58
11. IMPACTO ECONÓMICO	60
CAPÍTULO III: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA CRIPTOSPORIDIOSE EM VITELOS DE EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA TERCEIRA, AÇORES	61
1. OBJECTIVOS	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Caracterização geo-climática da ilha Terceira	61
2.2 Regime de exploração leiteira	62
2.3 População alvo	62
2.4 Colheita de amostras	62
2.5 Questionário	64
2.6 Detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	64
A) Preparação de esfregaços fecais	64

B) Coloração de Ziehl-Neelsen modificada	64
C) Observação microscópica.....	64
2.7 Análise estatística.....	65
3. RESULTADOS	66
3.1 Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	67
3.1.1 Prevalências de acordo com o grupo etário.....	67
3.1.2 Prevalências de acordo com a consistência das fezes	68
3.1.3 Intensidade de infecção	69
3.2 Inquérito realizado nas explorações	71
3.2.1 Local de nascimento dos vitelos.....	71
3.2.2 Separação dos vitelos após o nascimento.....	71
3.2.3 Administração de colostro.....	71
3.2.4 Alojamento ou contenção dos vitelos.....	71
3.2.5 Tipo de piso e higiene dos alojamentos interiores.....	72
3.2.6 Origem da água e tipo de abeberamento dos vitelos	73
3.2.7 História de diarreia neonatal e vacinação.....	73
3.2.8 Localização das explorações	74
4. DISCUSSÃO.....	74
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	80
BIBLIOGRAFIA.....	82
ANEXOS.....	92
ANEXO 1 - Questionário.....	92
ANEXO 2 – Localização das explorações	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Espécimes encontrados consoante a espécie.....	16
Tabela 2: Espécies de <i>Cryptosporidium</i> que afectam os peixes (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).	22
Tabela 3: Espécies de <i>Cryptosporidium</i> que afectam répteis e anfíbios (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).	22
Tabela 4: Espécies de <i>Cryptosporidium</i> que afectam os mamíferos (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).	23
Tabela 5: Espécies de <i>Cryptosporidium</i> que afectam as aves (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).	24
Tabela 6: Características de <i>Cryptosporidium</i> , risco epidemiológico e principais medidas preventivas.	59
Tabela 7: Consistência das fezes (adaptado de Larson et al., 1977).	63
Tabela 8: Amostras positivas de acordo com o score fecal.....	68
Tabela 9: Amostras positivas de acordo com a consistência das fezes.	69
Tabela 10: Nível de infecção de acordo com a consistência das fezes.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Método de digestão enzimática de amostras combinadas. A) Corte e pesagem. B) Digestão. C) Sedimentação. D) Leitura em estereomicroscópio.....	13
Figura 2: A) Método de Baermann modificado. B) Método de flutuação.	14
Figura 3: Método de esclarecimento com lactofenol. A) Piolho de equino (<i>Damalinia equi</i>) (x100). B) <i>Demodex canis</i> (x100).	17
Figura 4: Método de flutuação em sulfato de zinco. A) Quistos (a) e trofozoítos (b) de <i>Giardia</i> sp. (x100). B) Oocisto de <i>Cystoisospora</i> sp. (x400).	17
Figura 5: Método de flutuação em solução de Sheather. A) Ovo de <i>Trichuris</i> sp. (x400). B) Ovos de <i>Toxocara canis</i> (x100).	17
Figura 6: Método de flutuação em solução de Sheather. A) Ovo de <i>Ascaris suum</i> (a) e ovo de <i>Ascaris suum</i> sem envólucro rugoso (b) (x400). B) Ovo de <i>Nematodirus</i> sp. (x100).	18
Figura 7: Método de Baermann modificado. A) Larva L1 de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> (x400). B) Larvas L1 de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> coradas com lugol (x400).	18
Figura 8: Morfologia do esporozoítio de <i>Cryptosporidium</i> sp. (adaptado de O'Hara e Chen, 2011)...	25
Figura 9: Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i> (adaptado de Bouzid, Hunter, Chalmers e Tyler, 2013).	29
Figura 10: Ciclos de transmissão do <i>Cryptosporidium</i> (adaptado de Thompson et al., 2008).	34
Figura 11: Diferentes tipos de alojamento ou contenção dos vitelos. A) À corda no exterior. B) Em grupo no interior. C) Em grupo no exterior. D) Boxes individuais no interior (Fonte: original).	44
Figura 12: Mucosa intestinal de vitelo. A) Mucosa normal. B) Lesões da mucosa infectada por <i>C. parvum</i> (In Foster e Smith, 2009).	47
Figura 13: Vitelo com diarreia aquosa (Fonte: original).	48
Figura 14: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> corados com Ziehl-Neelsen modificada (Fonte: original). .	53
Figura 15: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. Microscopia de fluorescência. (In Gardiner, Fayer & Dubey, 1998).	54
Figura 16: Colheita e acondicionamento das amostras em frascos (Fonte: original).	63
Figura 17: Esfregaço fecal e coloração de Ziehl-Neelsen modificada (Fonte: original).	65

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Amostras para pesquisa de <i>Trichinella</i> spp. de acordo com a ilha de origem.	12
Gráfico 2: Amostras analisadas consoante a espécie.	14
Gráfico 3: Tipo de amostras analisadas.....	15
Gráfico 4: Tipos de resultados obtidos.....	15
Gráfico 5: Distribuição das amostras por grupos etários (N observado e % em relação ao total).	66
Gráfico 6: Distribuição das amostras por scores fecais (N observado e % em relação ao total).	67
Gráfico 7: Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> sp. segundo o grupo etário.....	68
Gráfico 8: Relação entre o nível de infecção e os grupos etários.....	70
Gráfico 9: Tipo de alojamento/contenção no exterior.....	72
Gráfico 10: Tipo de alojamento/contenção no interior.	72
Gráfico 11: Tipos de piso dos alojamentos.	72
Gráfico 12: Medidas de higiene nos alojamentos.	73
Gráfico 13: Tipo de abeberamento dos vitelos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC - arginina descarboxilase
BVD – diarreia viral bovina
Cl⁻ - cloro
DFMA – difluorometilarginina
DNA – ácido desoxirribonucleico
ECET – *Escherichia coli* enterotóxica
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EUA – Estados Unidos da América
HCO₃⁻ - bicarbonato
IC - imunocromatografia
IF – imunofluorescência
Ig – imunoglobulina
NaCl – cloreto de sódio
NTZ - nitazoxanida
OIE - Office International des Épizooties
OPG – oocistos por grama de fezes
PCR – reação em cadeia de polimerase
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGI₂ – prostaglandina I₂
PISA – Programa informático de saúde animal
RNA – ácido ribonucleico
RT-PCR - transcriptase reversa-PCR
SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida
SREA – Serviço Regional de Estatística dos Açores
ZN – Ziehl-Neelsen
µm – micrómetros
nm – nanómetros

CAPÍTULO I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO

1. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO REGIONAL DE VETERINÁRIA DOS AÇORES

O Laboratório Regional de Veterinária dos Açores (LRVA) é um serviço oficial do Governo Regional dos Açores situado na ilha Terceira, o qual se dedica à análise laboratorial na área da saúde animal e segurança alimentar de acordo com a política sanitária regional dos Açores. O LRVA desenvolve diversas atividades no âmbito da Sanidade Animal e da Higiene Pública Veterinária nomeadamente:

- i. No âmbito da sanidade animal realiza análises na área da anatomopatologia, histopatologia, parasitologia, bacteriologia, virologia, micologia, química/toxicologia e biologia molecular;
- ii. Desenvolve actividades nas áreas de química, físico-química, toxicologia, bacteriologia e micologia dos produtos alimentares que possam pôr em risco a saúde do consumidor e dos animais no âmbito da higiene pública veterinária;
- iii. Realiza análises no âmbito do contraste leiteiro prestando também apoio aos produtores na melhoria da qualidade do leite;
- iv. Presta apoio directo a organismos oficiais com competências na área do controlo oficial de produtos de origem animal tais como, a inspecção sanitária e inspecção de fronteiras;
- v. Planeia e executa trabalhos de investigação aplicada em áreas de interesse económico e sanitário a nível regional;
- vi. Presta também apoio laboratorial nas áreas da sua competência a entidades privadas tais como: associações de produtores, cooperativas, clínicas veterinárias, produtores pecuários e proprietários de animais.

O LRVA está apto para a execução de análises laboratoriais no âmbito de vários planos e programas nacionais de erradicação, vigilância e controlo:

- i. Programa Nacional e Programas Especiais da Erradicação da Brucelose Bovina e dos Pequenos Ruminantes;
- ii. Programa Nacional Plurianual de Erradicação da Leucose Enzoótica Bovina;
- iii. Programa Nacional de Controlo de Salmonelas;
- iv. Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB);
- v. Plano Nacional de Controlo de Resíduos;

- vi. Plano de Controlo Oficial Sistemático de Estabelecimentos de Venda e de Alimentos de Origem Animal – Açores.

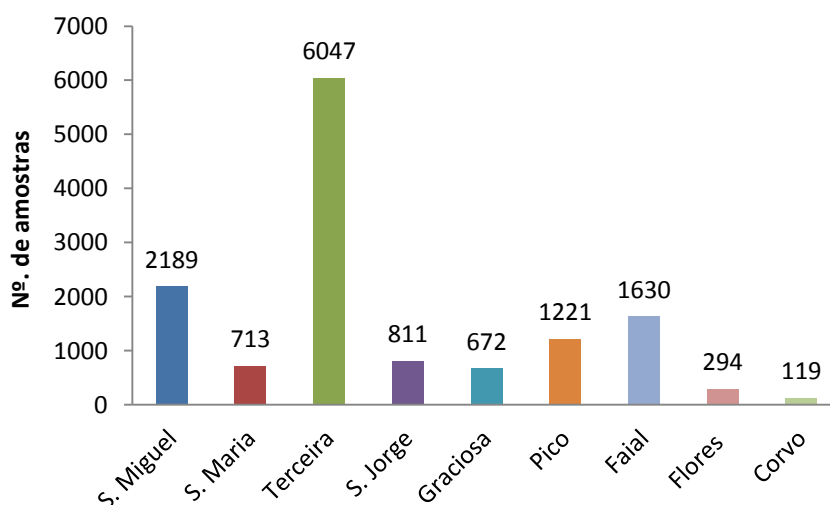
2. CASUÍSTICA DO SECTOR DE PARASITOLOGIA DO LRVA

O sector de Parasitologia do LRVA desenvolve a sua actividade na área do diagnóstico parasitológico, solicitado pelas entidades oficiais, médicos veterinários, produtores pecuários e público em geral das várias ilhas do arquipélago dos Açores. As análises realizadas são essencialmente análises coprológicas, pesquisa de hemoparasitas, identificação de endoparasitas e ectoparasitas, pesquisa de *Tritrichomonas foetus* e pesquisa de larvas de *Trichinella* spp. pelo método de digestão de amostras combinadas utilizando um agitador magnético. Durante o período de estágio que decorreu entre Novembro de 2012 e Abril de 2013 o sector de Parasitologia recebeu para análise um total de 14046 amostras de várias espécies animais e provenientes das várias ilhas dos Açores o que se traduz em aproximadamente 840 horas de trabalho realizadas durante este período.

2.1 Pesquisa de larvas de *Trichinella* spp.

Das amostras recebidas e analisadas 13798 eram amostras de pilares de diafragma de suínos para pesquisa de larvas de *Trichinella* spp. O sector da Parasitologia do LRVA é responsável pela pesquisa de *Trichinella* spp. em amostras de todos os suínos abatidos para consumo humano em todos os matadouros da região sendo por isso as amostras analisadas provenientes de todas as ilhas dos Açores (gráfico 1).

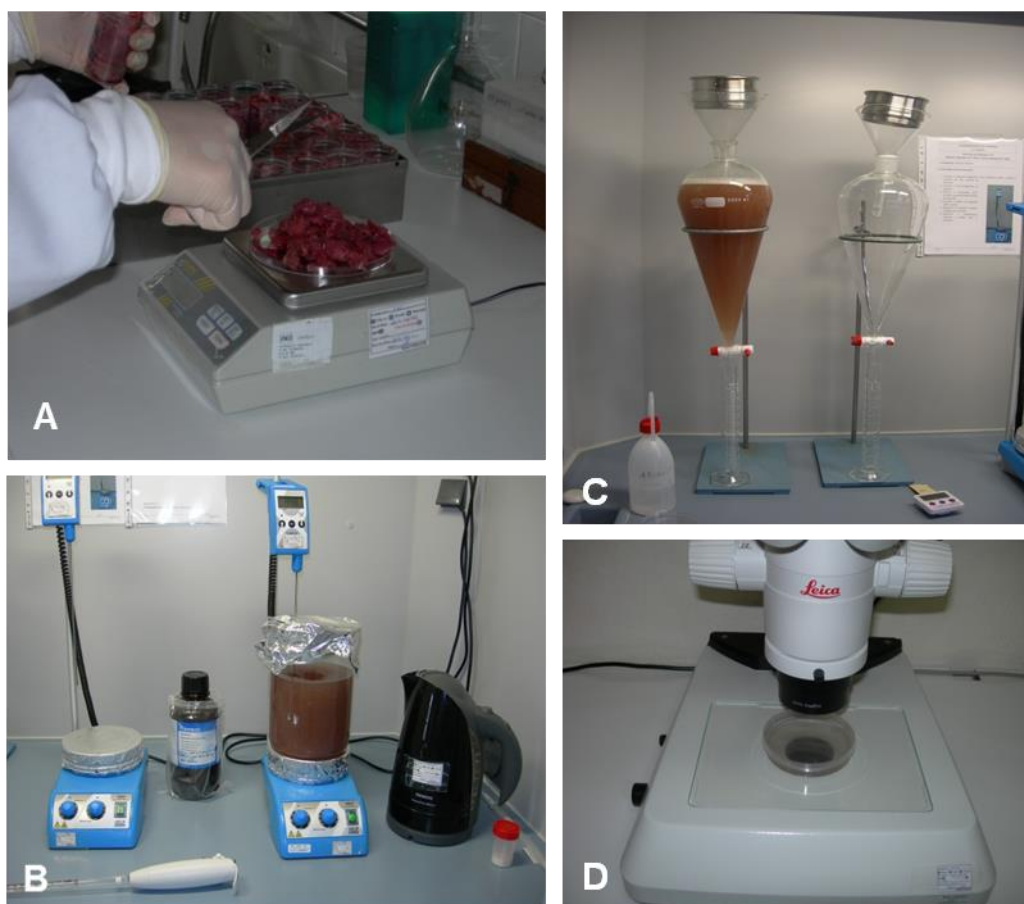
Gráfico 1: Amostras para pesquisa de *Trichinella* spp. de acordo com a ilha de origem.



O método utilizado nesta pesquisa (figura 1) é o método de digestão de amostras combinadas utilizando um agitador magnético de acordo com o regulamento (CE) nº 2075/2005 de 05 de Dezembro de 2005. Esta prova encontra-se acreditada pelo IPAC (Instituto Português da Acreditação) desde 2010 segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005.

Todas as amostras analisadas neste âmbito foram negativas não tendo sido observadas larvas de *Trichinella* spp.

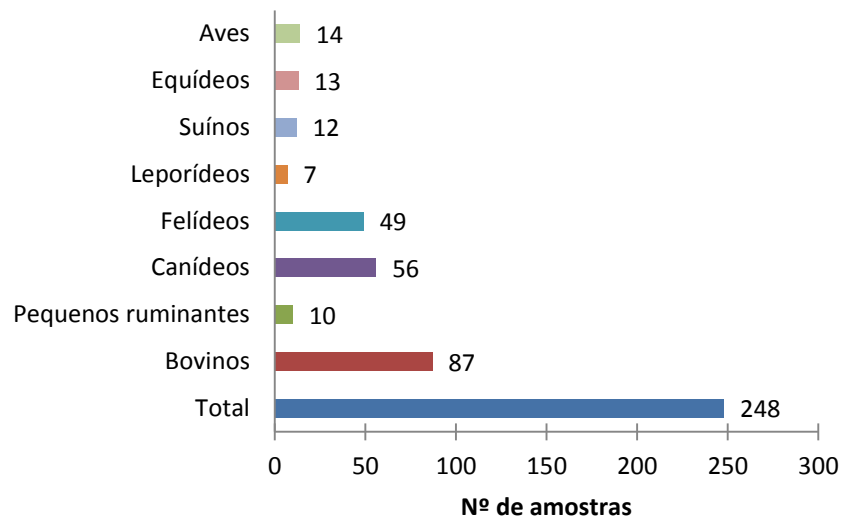
Figura 1: Método de digestão enzimática de amostras combinadas. **A)** Corte e pesagem. **B)** Digestão. **C)** Sedimentação. **D)** Leitura em estereomicroscópio.



2.2 Outras pesquisas

No âmbito de outros diagnósticos parasitológicos o sector de Parasitologia do LRVA recebeu e analisou durante os seis meses de estágio 248 amostras provenientes de várias ilhas dos Açores e de diferentes espécies animais. As amostras provenientes de bovinos foram as mais representadas, seguidas das amostras provenientes de canídeos e felídeos, como demonstrado no gráfico 2.

Gráfico 2: Amostras analisadas consoante a espécie.



Em relação ao tipo de amostras analisadas (gráfico 3) no sector de Parasitologia as fezes foram o tipo de amostra mais comum sendo que eram essencialmente para pesquisa de parasitas gastrointestinais e parasitas pulmonares através do método de flutuação com sulfato de zinco e solução de Sheather, método de sedimentação e método de Baermann modificado (figura 2), seguindo-se as raspagens de pele e pelos para pesquisa de agentes causadores de sarna realizado por esclarecimento com lactofenol (figura 3).

Figura 2: A) Método de Baermann modificado. B) Método de flutuação.

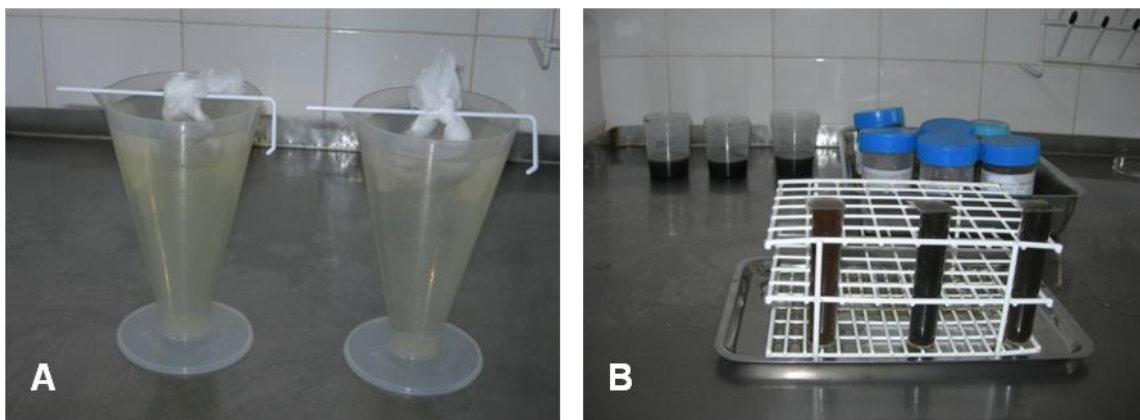
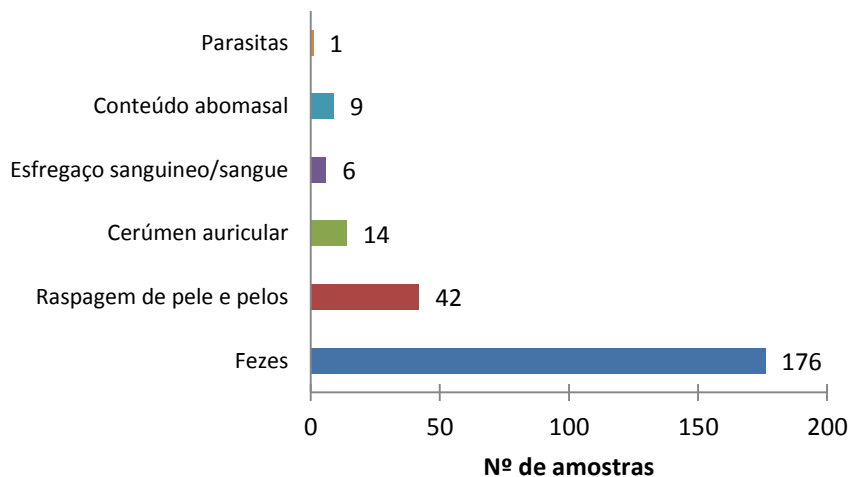


Gráfico 3: Tipo de amostras analisadas.



Das amostras analisadas 184 (74,2%) possuíam um ou mais elementos parasitários, as restantes 64 (25,8%) amostras foram negativas uma vez que não se encontrou qualquer tipo de elemento parasitário.

No gráfico 4 está demonstrado o tipo de resultados obtidos nas amostras positivas, de acordo com os principais grupos, sendo que os protozoários e nematodes gastrointestinais (figuras 4, 5 e 6) apareceram em maior número, seguindo-se os ácaros (figura 3) e os nematodes pulmonares (figura 7). Também na tabela 1 estão descritos os vários géneros e espécies assinalados nas amostras.

Gráfico 4: Tipos de resultados obtidos.

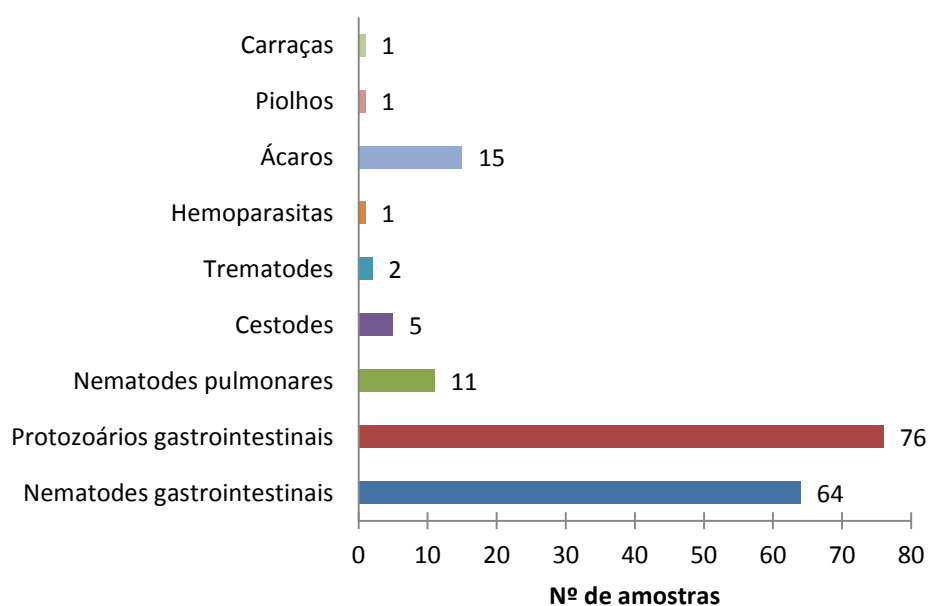


Tabela 1: Espécimes encontrados consoante o hospedeiro.

HOSPEDEIRO	RESULTADOS
Bovinos	Ovos tipo Tricostrogilídeo Ovos de <i>Nematodirus</i> sp. Ovos de <i>Toxocara vitulorum</i> Ovos de <i>Fasciola</i> sp. Ovos de <i>Moniezia benedeni</i> Oocistos de <i>Eimeria</i> spp. Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.
Pequenos ruminantes	Ovos tipo Tricostrogilídeo Ovos de <i>Nematodirus</i> sp. Ovos de <i>Trichuris</i> sp. Oocistos de <i>Eimeria</i> spp. L1 de <i>Muellerius capillaris</i>
Canídeos	Ovos de <i>Toxocara canis</i> Ovos de <i>Trichuris</i> sp. Ovos tipo Ancilostomídeo Quistos de <i>Giardia</i> sp. Ovos de <i>Taenia</i> sp. <i>Demodex canis</i> <i>Otodectes cynotis</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Felídeos	Oocistos de <i>Cystoisospora</i> sp. L1 de <i>Aelurostrogylus abstrusus</i> <i>Haemobartonella felis</i>
Suíños	Ovos de <i>Ascaris suum</i>
Equídeos	Ovos tipo Estrongilídeo Piolho (<i>Damalinia equi</i>)
Aves	Ovos de <i>Capillaria</i> sp. Ovos de <i>Ascaridia</i> sp. Oocistos de <i>Eimeria</i> sp.
Leporídeos	Oocistos de <i>Eimeria</i> sp.

Figura 3: Método de esclarecimento com lactofenol. **A)** Piolho de equino (*Damalinia equi*) (x100). **B)** *Demodex canis* (x100).

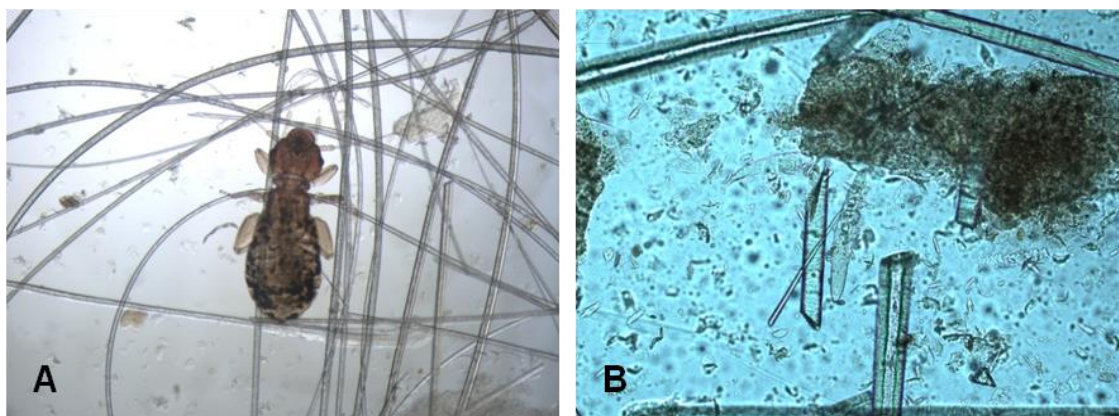


Figura 4: Método de flutuação em sulfato de zinco. **A)** Quistos (a) e trofozoítos (b) de *Giardia* sp. (x100). **B)** Oocisto de *Cystoisospora* sp. (x400).

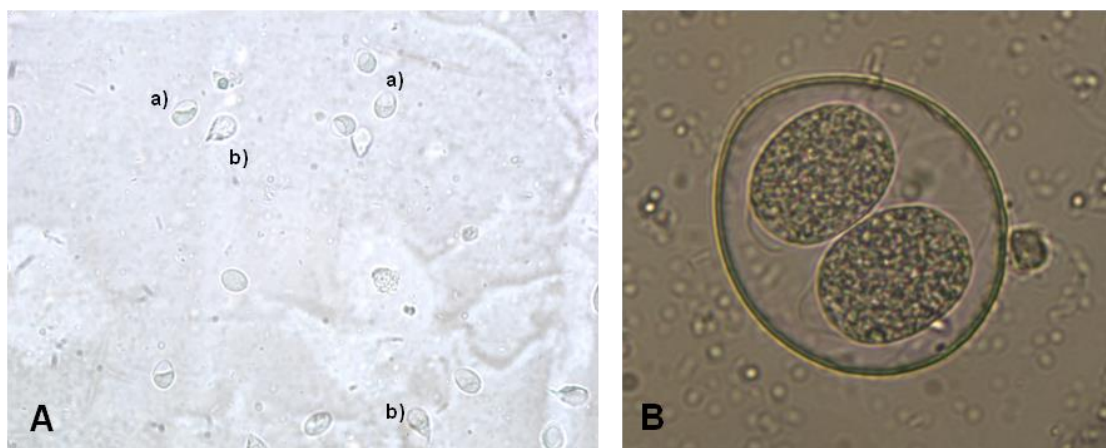


Figura 5: Método de flutuação em solução de Sheather. **A)** Ovo de *Trichuris* sp. (x400). **B)** Ovos de *Toxocara canis* (x100).

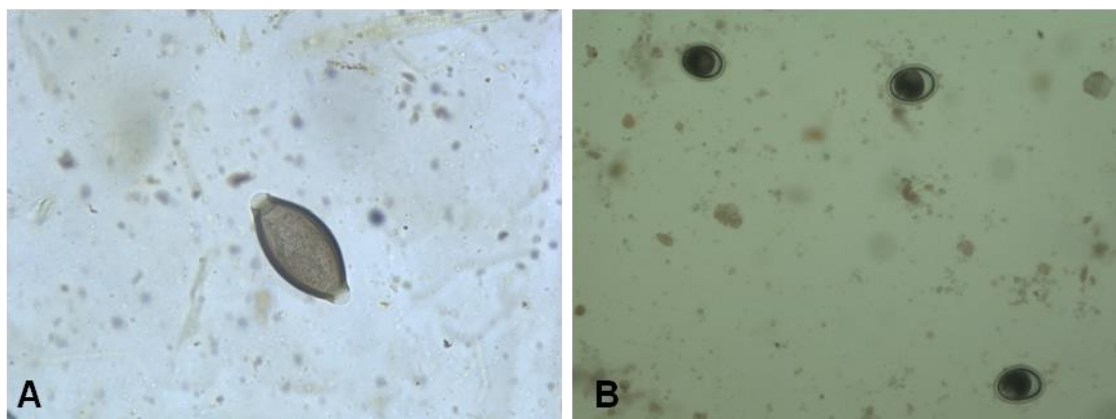


Figura 6: Método de flutuação em solução de Sheather. **A)** Ovo de *Ascaris suum* (a) e ovo de *Ascaris suum* sem envólucro rugoso (b) (x400). **B)** Ovo de *Nematodirus* sp. (x100).

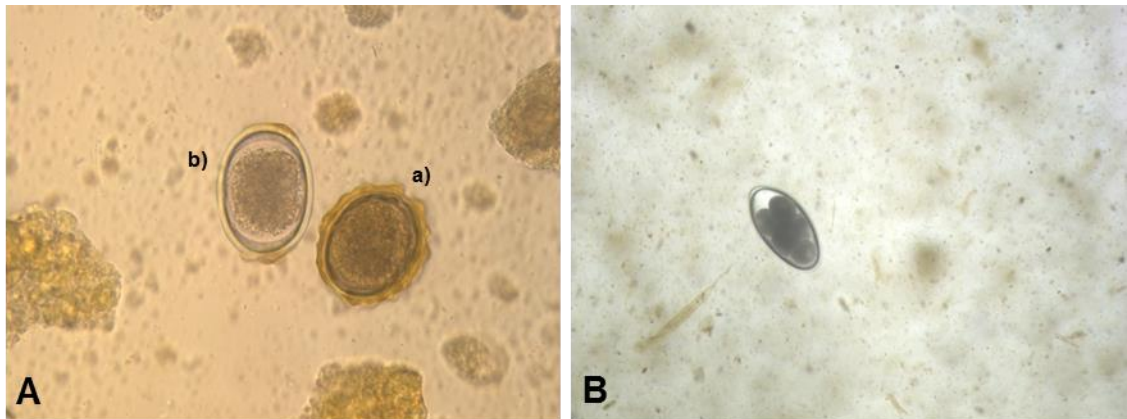


Figura 7: Método de Baermann modificado. **A)** Larva L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* (x400). **B)** Larvas L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* coradas com lugol (x400).



CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma parasitose difundida mundialmente. É provocada por protozoários, parasitas obrigatórios e intracelulares pertencentes ao género *Cryptosporidium*. As diferentes espécies de *Cryptosporidium* infectam mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios.

O género *Cryptosporidium* é mantido na natureza através da sua forma infectante, os oocistos esporulados. Os oocistos de *Cryptosporidium* têm distribuição ubiquitária, possuem elevada resistência a vários agentes físicos e químicos e elevado potencial reprodutivo, características essenciais à sua sobrevivência e disseminação no meio ambiente. A fase de oocisto é também de grande importância na detecção e identificação de *Cryptosporidium* sp.

O seu ciclo de vida é directo e monoxeno possuindo várias particularidades tais como: a sua localização extracitoplasmática e a capacidade de autoinfecção, importantes na dispersão da doença e no seu tratamento (De Graaf, Vanopdenbosch, Ortega-Mora, Abbassi, Peeters, 1999).

A via de transmissão de *Cryptosporidium* é fecal-oral, sendo o hospedeiro susceptível infectado pela ingestão de oocistos esporulados. A transmissão da infecção pode ocorrer de forma directa pelo contacto com hospedeiros doentes, ou de forma indirecta pela ingestão de água ou alimentos contaminados.

Cryptosporidium parvum é considerada a espécie com maior potencial zoonótico, e os vitelos são o seu principal reservatório. Estes animais têm sido identificados como os agentes causais de surtos de criptosporidiose humana transmitida pelo consumo de água e alimentos contaminados. Em indivíduos imunodeprimidos a doença pode adquirir formas graves e potencialmente fatais, sendo as crianças consideradas também uma população de risco.

A Criptosporidiose bovina foi reportada pela primeira vez nos anos 1970 por Panciera, Thomassen e Garner (1971). Em vitelos recém-nascidos a criptosporidiose é considerada uma doença importante caracterizada por diarreia líquida e profusa com início agudo que pode ser acompanhada por depressão, desidratação, anorexia e nos casos severos pode levar à morte. Os vitelos infectam-se entre a primeira e a quarta semana de idade e a duração da infecção é curta, durando cerca de duas semanas (O'Handley et al., 1999). Os vitelos são responsáveis pela manutenção da infecção dentro das explorações e são considerados a principal fonte de contaminação ambiental.

A falta de um meio eficaz para prevenir ou tratar a infecção continua a ser um desafio para médicos veterinários e outros profissionais ligados à produção animal. A necessidade de se

identificar os factores de risco e a prática rotineira de medidas preventivas são a melhor forma de reduzir o impacto económico sobre a produção, mas também de aliviar preocupações com o ambiente e com a saúde pública.

No contexto do que já foi dito, o presente estudo consistiu numa revisão do conhecimento da criptosporidiose bovina e na abordagem de outros temas relacionados com o agente infeccioso, as relações epidemiológicas da doença e os métodos de diagnóstico da criptosporidiose.

Dada a importância da criptosporidiose bovina em termos de impacto económico e saúde pública, decidiu-se avaliar a importância da doença em vitelos. Desta forma o principal objectivo deste estudo foi a investigação da presença de *Cryptosporidium* sp. em vitelos pertencentes a explorações leiteiras da ilha Terceira.

I. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

1. HISTÓRIA

Em 1907 Ernest Edward Tyzzer foi o primeiro a descrever e a publicar sobre um parasita isolado nas glândulas gástricas de ratos de laboratório. Em 1910 descreveu este parasita com grande detalhe e propôs o nome *Cryptosporidium* como novo género e *Cryptosporidium muris* como espécie (Xiao, Fayer, Ryan, Upton, 2004; Fayer, 2008).

Um segundo isolado, *Cryptosporidium parvum*, foi também identificado e descrito por Tyzzer em 1912 (Fayer e Ungar, 1986).

Durante 48 anos após a primeira publicação de Tyzzer não surgiram novos estudos ou informações sobre *Cryptosporidium* sp., por não ser reconhecido de importância económica, médica ou veterinária (Fayer, 2008).

A primeira espécie reconhecida como causa de doença, *Cryptosporidium meleagridis*, foi descoberta em 1955, associada a diarreia em perús (Slavin, 1955 citado por De Graaf et al., 1999).

Só nos anos 70 surgiu um maior interesse no *Cryptosporidium*, quando foi reportado a sua associação com diarreias em bovinos (Fayer, 2008).

O facto de o género *Cryptosporidium* ter sido mais tarde reconhecido como agente causador de doença no Homem, em especial nos doentes imunodeprimidos, assim como a sua associação com surtos de diarreia em humanos, provocados pelo consumo de água, trouxe a este parasita um maior reconhecimento em todo o mundo. O trabalho científico foi encorajado em muitas áreas nomeadamente no campo veterinário, uma vez que a produção animal intensiva é responsável por ser fonte de libertação de elevado número de oocistos resistentes em águas superficiais (De Graaf et al., 1999).

O interesse da criptosporidiose na área veterinária tem vindo a aumentar, pelo facto de ser considerada uma doença de difícil controlo em muitos animais de produção, resultando em significativas perdas económicas mas também devido à crescente preocupação para a saúde pública (De Graaf et al., 1999; Madeira de Carvalho, Martins, Sousa, Bacelar, Cannas da Silva, 2011).

2. TAXONOMIA

Cryptosporidium é o género que inclui protozoários parasitas obrigatórios, intracelulares, cujas espécies infectam répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos. Pertence ao reino

Protozoa, filo Apicomplexa, classe Coccidea, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae (Fayer, 2008; Levine, 1984 citado por Rossle e Latif, 2013).

Apesar das semelhanças nos ciclos de vida, várias características distinguem o género *Cryptosporidium* do resto das coccídeas: a relativa especificidade do hospedeiro, a capacidade de autoinfecção endógena, a localização intracelular e extracitoplasmática na célula hospedeira e a resistência à terapêutica antiparasitária (Smith, Caccio, Cook, Nichls, Tait, 2007).

A classificação baseada apenas na morfologia tem sido difícil, uma vez que as espécies de *Cryptosporidium* são morfologicamente idênticas. Hoje em dia recorre-se à biologia molecular para identificar espécies e genótipos. Até à data cerca de 21 espécies e 60 genótipos de *Cryptosporidium* já foram classificados como válidos (Rossle e Latif, 2013).

A falta de dados biológicos e moleculares torna difícil a identificação do estatuto taxonómico do *Cryptosporidium* encontrado nos peixes, no entanto baseado em observações microscópicas duas espécies receberam nomes (Tabela 2): *Cryptosporidium molnari* e *Cryptosporidium scophthalmi*. O género *Cryptosporidium* já foi reportado em cerca de 80 espécies de cobras, lagartos e tartarugas (Fayer, 2010) e também em anfíbios (Tabela 3).

Tabela 2: Espécies de *Cryptosporidium* que afectam os peixes (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).

Espécie	Localização primária	Hospedeiro principal	Infecta humanos
<i>C. molnari</i>	Gástrica	Peixes	Não
<i>C. scophthalmi</i>	Intestinal	Peixes	Não

Tabela 3: Espécies de *Cryptosporidium* que afectam répteis e anfíbios (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).

Espécie	Localização primária	Hospedeiro principal	Infecta humanos
<i>C. serpentis</i>	Gástrica	Cobras	Não
<i>C. fragile</i>	Gástrica	Sapos	Não
<i>C. saurophilum</i>	Intestinal	Cobras e lagartos	Não

Mais de 30 espécies de aves por todo o mundo são conhecidas como portadoras de *Cryptosporidium*. Cada uma das três espécies (Tabela 5), *Cryptosporidium meleagridis*,

Cryptosporidium baileyi e *Cryptosporidium galli* pode infectar numerosas espécies de aves, mas diferem no seu hospedeiro primário e no local de infecção (Fayer, 2010).

Em todo o mundo são conhecidas mais de 150 espécies de mamíferos de 12 ordens diferentes, como hospedeiras do *Cryptosporidium*. Quinze espécies já são conhecidas em mamíferos (Tabela 4): *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. muris*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. macropodum*, *C. ryanae*, *C. cuniculus*, *C. xiaoi* e *C. scrofarum* (Fayer e Santin, 2009; Fayer, 2010; Rossle e Latif, 2013; Kvac et al., 2013; Koehler, Whipp, Haydon, Gasser, 2014). Nos animais de produção, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi* e *C. meleagridis* têm sido responsáveis por grande morbidade e surtos de doença (Office International des Épizooties [OIE], 2008).

Além das espécies válidas existem isolados de vários hospedeiros vertebrados, referidos na literatura e listados num banco de genes. Estes isolados não possuem estatuto taxonómico e referem-se a genótipos baseados no hospedeiro de origem, sem dúvida alguns deles serão eventualmente reconhecidos como espécies (OIE, 2008; Fayer, 2010).

Tabela 4: Espécies de *Cryptosporidium* que afectam os mamíferos (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).

Espécie	Localização primária	Hospedeiro principal	Infecta humanos
<i>C. muris</i>	Gástrica	Roedores	Sim
<i>C. parvum</i>	Intestinal	Mamíferos	Sim
<i>C. wrairi</i>	Intestinal	Porcos da índia	Não
<i>C. felis</i>	Intestinal	Gatos	Sim
<i>C. andersoni</i>	Gástrica (abomaso)	Gado bovino	Sim
<i>C. canis</i>	Intestinal	Cães	Sim
<i>C. hominis</i>	Intestinal	Humanos	Sim
<i>C. suis</i>	Intestinal	Porcos	Sim
<i>C. bovis</i>	Desconhecida	Gado bovino	Não
<i>C. fayeri</i>	Desconhecida	Canguru vermelho	Não
<i>C. ryanae</i>	Desconhecida	Gado bovino	Não
<i>C. macropodum</i>	Desconhecida	Canguru cinzento	Não
<i>C. cuniculus</i>	Intestinal	Coelho, canguru cinzento	Sim
<i>C. xiaoi</i>	-	Ovelhas, cabras	Não
<i>C. scrofarum</i>	Intestinal	Porco doméstico	Não

Tabela 5: Espécies de *Cryptosporidium* que afectam as aves (adaptado de OIE, 2008; Fayer, 2010).

Espécie	Localização primária	Hospedeiro principal	Infecta humanos
<i>C. meleagridis</i>	Intestinal	Perús	Sim
<i>C. baileyi</i>	Intestinal	Galinhas	Sim
<i>C. galli</i>	Gástrica (proventrículo)	Galinhas	Não

3. CARACTERÍSTICAS DO GÉNERO *CRYPTOSPORIDIUM*

3.1 Morfologia

A forma infectante e o único estado exógeno do *Cryptosporidium* corresponde ao oocisto, elemento de resistência do parasita que permite a disseminação e infecção. Dentro do grupo das coccídeas o género *Cryptosporidium* é o que possui os oocistos de menor tamanho. A sua forma pode ir de esférica a oval e medem em média 7,4 x 5,6 µm para *C. muris* e 5,0 x 4,5 µm para *C. parvum*, as espécies infectantes para a maioria dos mamíferos (Fayer e Ungar, 1986).

Os oocistos apresentam uma parede que pode ser fina ou espessa dependendo das diferentes fases de desenvolvimento. A parede é uma estrutura trilaminar com uma espessura média de 50 nm, lisa e incolor. A camada externa é de espessura irregular e possui em média cerca de 10 nm, abaixo desta encontra-se a camada electrodensa com 2,5 nm e abaixo a camada mais interna composta por duas zonas; a zona externa e a zona interna, com 11,6 nm e 25,8 nm de espessura respectivamente (Fayer e Ungar, 1986; Fayer, 2008).

A parede dos oocistos é contínua com exceção de um pólo que é interrompido por uma única sutura que se abre e permite a libertação dos quatro esporozoítos infectantes. A parede exterior dos oocistos parece possuir abundante material glicoproteico e a camada central é de composição lipídica e glicoproteica que lhe confere uma certa rigidez e é responsável pela coloração álcool ácido-resistente característica do género. A camada interna que aparece linear e filamentosa, é uma glicoproteína que proporciona alguma rigidez e elasticidade à parede (Fayer, 2008).

O oocisto maduro contém quatro esporozoítos nus e um corpo residual central composto por numerosos pequenos grânulos. O corpo residual possui elementos essenciais para a sobrevivência do parasita, tais como: corpo lipídico, grânulos de amilopectina, ribossomas e citomembranas (Fayer, 2008). Os esporozoítos, tal como representado na figura 8, são em forma de banana ou crescente com um tamanho aproximado de 1 µm, a extremidade anterior é ligeiramente pontiaguda e a extremidade posterior redonda (Fayer e Ungar, 1986; Xiao et al., 2004).

Dentro do oocisto os esporozoítos dispõem-se paralelamente com a extremidade anterior adjacente ao polo do oocisto que contém a sutura. Cada esporozoíto contém no terço posterior do corpo um núcleo proeminente e uma organela semelhante a uma mitocôndria. Na extremidade anterior está presente um complexo apical, composto por organelas secretórias (róptrias, micronemas e grânulos densos) e componentes não vesiculares. (Fayer e Ungar, 1986; Del Cocco, Córdoba e Basualdo, 2009).

Outras características morfológicas observadas nos oocistos de outras coccídeas como o micrópilo e o grânulo polar estão ausentes nos oocistos do género *Cryptosporidium* (Fayer e Ungar, 1986).

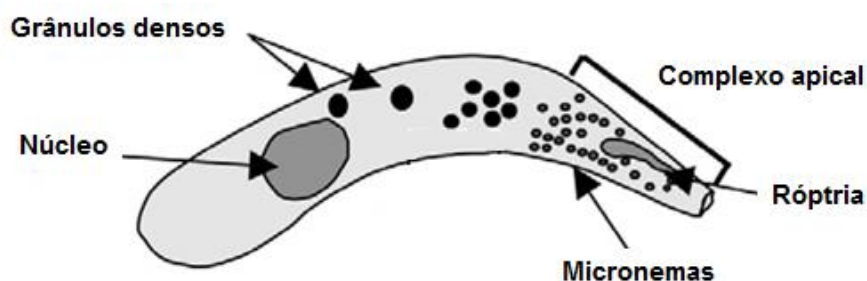
Os trofozoítos são formas intracelulares redondas ou ovais com 2,0-2,5 µm de diâmetro. São encontrados dentro de vacúolos parasitóforos formados por citoplasma da célula hospedeira e pelo próprio protozoário. Caracterizam-se por possuir um proeminente nucléolo dentro de um único núcleo com 1,0-1,3 µm de diâmetro e pela ausência de complexo apical (Fayer e Ungar, 1986; Fayer, 2008).

Os merozoítos tipo I e tipo II aparentam ser morfológicamente idênticos, são em forma de crescente com ambas as extremidades arredondadas e medem cerca de 5 x 1 µm de diâmetro, contêm um único núcleo, retículo endoplasmático e uma variedade de grânulos não identificados (Fayer e Ungar, 1986).

Os microgametas maduros do género *Cryptosporidium* são em forma de cunha com a extremidade anterior achatada, não possuindo flagelo, nem mitocôndrias (Fayer, 2008).

As formas jovens dos macrogamontes não se distinguem dos trofozoítos, vão de esféricos a ovais com um único grande núcleo e nucléolo, retículo endoplasmático, corpos lipídicos e grânulos de amilopectina (Fayer e Ungar, 1986; Fayer, 2008).

Figura 8: Morfologia do esporozoíto de *Cryptosporidium* sp. (adaptado de O'Hara e Chen, 2011).



3.2 Bioquímica e metabolismo

O recém-sequenciado genoma de *C. parvum* revelou que este parasita difere significativamente de outros Apicomplexa em quase todas as vias metabólicas importantes (Abrahamsen et al., 2004).

Embora muitas espécies de *Cryptosporidium* estejam descritas na literatura, a quase totalidade das suas características bioquímicas disponíveis são fruto do estudo de *C. parvum*. É também assumido que as vias metabólicas de *C. parvum* e outras espécies do género são bastante idênticas (Xu et al., 2004).

Uma característica única do género *Cryptosporidium* é a sua incapacidade de sintetizar quase tudo *de novo*, ácidos gordos, aminoácidos e nucleótidos. Isto indica que se adaptou a uma vida parasitária extrema e que depende completamente do hospedeiro para lhe fornecer nutrientes (Zhu, 2008). Transportadores para açúcares, nucleótidos e aminoácidos podem ser facilmente identificados no seu genoma (Abrahamsen et al., 2004).

Aparentemente os ácidos gordos não são fonte de energia de *Cryptosporidium*, devido à inexistência da via da β -oxidação. Apesar da presença de um organelo que parece representar uma verdadeira mitocôndria, não existe ciclo de Krebs no *C. parvum* (Rider e Zhu, 2010).

A principal via energética de *C. parvum* é provavelmente a glicólise e esta pode ser dependente de polissacáridos como a amilopectina, para as reservas básicas de energia. Enzimas para a produção e degradação de polissacáridos estão presentes incluindo a fosforilase e a 1,6-glucosidase (Rider e Zhu, 2010).

De forma semelhante a outros Apicomplexa, o género *Cryptosporidium* é incapaz de sintetizar purinas *de novo*. Contudo a via das purinas é baseada no *uptake* de adenosina do hospedeiro através dum transportador. A síntese de pirimidinas por via metabólica também está ausente e o seu metabolismo baseia-se na utilização de transportadores de nucleótidos (Zhu, 2008).

Embora os aminoácidos sejam as unidades estruturais básicas das proteínas, o género *Cryptosporidium* é aparentemente incapaz de os sintetizar. Todos os genes responsáveis pela síntese de aminoácidos estão ausentes no genoma do *C. parvum*. Em alternativa este parasita possui pelo menos 11 transportadores de aminoácidos responsáveis pela extracção de aminoácidos das células hospedeiras e do lúmen intestinal. No entanto a interconversão de certo número de aminoácidos pode ocorrer (Abrahamsen et al., 2004; Rider e Zhu, 2010).

A síntese de poliaminas – grupo de moléculas essenciais a todas as células – é efectuada pela via da arginina descarboxilase (ADC). A actividade da ADC e o desenvolvimento de *C. parvum* podem ser inibidos pelo difluorometilarginina (DFMA), desta forma a via das poliaminas tem sido encarada como um potencial alvo de fármacos no *C. parvum* (Zhu, 2008).

Devido à falta de DNA extracromossomal, *Cryptosporidium* apenas necessita de manter um único genoma nuclear. A replicação de DNA e a transcrição utiliza elementos típicos eucariotas como as DNA e RNA polimerases (Abrahamsen et al., 2004).

3.3 Resistência e sobrevivência no ambiente

Como único mecanismo de transmissão, os oocistos evoluíram para serem dispersos e sobreviver em ambientes adversos durante longos períodos de tempo (Fayer, 2008). Eles são altamente resistentes a pressões naturais e a muitos desinfectantes químicos artificiais.

De acordo com Fayer (2008) vários estudos laboratoriais têm tentado determinar a redução do número de oocistos viáveis após a exposição a vários factores físicos tais como, o calor, o frio, a radiação, a pressão e a desidratação.

Alguns oocistos de *C. parvum* quando conservados em água a 5-15°C permanecem infectantes durante 6 meses, embora o número de oocistos diminua progressivamente com o aumento do tempo de armazenamento (Fayer, Trout, Jenkins, 1998a). À medida que as temperaturas descem abaixo dos 5°C ou sobem acima dos 15°C, o tempo de sobrevivência diminui (Fayer, 2008).

A longevidade dos oocistos de *C. parvum* a várias temperaturas parece estar ligada às reservas energéticas de hidratos de carbono dos esporozoítos e aos corpos residuais que são consumidos mais rapidamente quanto mais elevada for a temperatura (Fayer et al., 1998a).

A congelação mata os oocistos. A congelação a -70°C resulta na morte imediata dos oocistos de *C. parvum* mesmo na presença de uma variedade de crioprotectores. A temperaturas de congelação superiores os oocistos sobrevivem mais tempo, alguns oocistos suportam temperaturas de -20°C às quais são viáveis até 8 horas (Robertson, Campbell, Smith, 1992).

Análises realizadas em amostras de solo revelaram a presença de menor número de oocistos de *Cryptosporidium* em solos neutros ou de pH alcalino do que em solos de pH baixo (Barwick et al., 2003 citado por Fayer, 2004).

Vários estudos mostraram a eficácia da radiação ultravioleta em tornar os oocistos de *Cryptosporidium* não infectantes, pois doses de radiação iguais ou inferiores a 10mJ/cm² resultam numa redução significativa da capacidade infectante dos oocistos (Fayer, 2008).

Os oocistos de *C. parvum* têm mostrado uma resistência considerável à acção da maioria dos desinfectantes comerciais e as concentrações efectivas de outros são geralmente impraticáveis para desinfecção fora dos laboratórios. As elevadas concentrações necessárias para reduzir significativamente a infectividade dos oocistos, ou são muito dispendiosas, altamente tóxicas e requerem um longo e inaceitável tempo de exposição, ou são eficazes apenas a temperaturas elevadas (Fayer, 2008).

Os compostos à base de peróxido de hidrogénio, dióxido de cloro e amónia parecem ser os desinfectantes que possuem maior eficácia. Embora os compostos à base de bromo, cloro e iodo também reduzam a viabilidade dos oocistos, as elevadas temperaturas e os longos períodos de exposição requeridos diminuem a sua aplicabilidade. O ozono parece ser um dos mais eficazes desinfectantes químicos contra os oocistos (Fayer, 2008).

A sobrevivência no meio ambiente também é afectada pelas condições de humidade. Sob condições favoráveis de elevada humidade e temperaturas inferiores a 20°C os oocistos de *C. parvum* podem sobreviver no meio ambiente cerca de 6 meses a partir dos quais a sua infectividade diminui (Fayer et al., 1998a; OIE, 2008). Os oocistos de *Cryptosporidium* permanecem viáveis sob condições de frio e humidade por vários meses, em especial nos climas nórdicos onde as temperaturas da água permanecem baixas mas acima da congelação (Fayer, 2004).

A dessecação é letal para os oocistos. Robertson et al. (1992) demonstraram que apenas 3% dos oocistos se encontravam viáveis após 2 horas de dessecação e 100% morriam após 4 horas.

Os oocistos também sobrevivem na água salgada por longos períodos de tempo. A viabilidade dos oocistos mantem-se por mais de 35 dias a 4°C em água do mar (Robertson et al., 1992).

A exposição de *Cryptosporidium* sp. a condições redutoras como as enzimas pancreáticas ou sais biliares, resulta num aumento da rotura do oocisto e libertação dos esporozoítos (De Graaf et al., 1999; Fayer, 2008).

3.4 Microbiótomo

Os oocistos de *Cryptosporidium* têm presença ubiqüitária no meio ambiente (Xiao et al., 2004). Podem ser encontrados em águas superficiais de diferentes origens e densidades, assim como em águas subterrâneas (Fayer, Morgan, Upton, 2000a; Joachim, 2004).

Solos de diferentes tipos também permitem a sobrevivência e o movimento de oocistos de *Cryptosporidium* tanto à superfície como em profundidade (Fayer et al., 2000a).

Segundo Fayer et al. (2000a) alimentos frescos, água potável e água utilizada nas actividades lúdicas como, piscinas, lagos ou barragens, podem ser portadores de oocistos devido à contaminação com matéria fecal. A presença de oocistos também já foi detectada em bivalves. Nos hospedeiros o sítio primário de infecção do *C. parvum* e *C. hominis* é o intestino delgado. Em ratos e bezerros, o íleo proximal e a junção ileocecal são os sítios nos quais *Cryptosporidium* produz a infecção (Del Cocco et al., 2009). Em animais e humanos com graves imunodeficiências, este parasita também tem sido encontrado em sítios extraintestinais

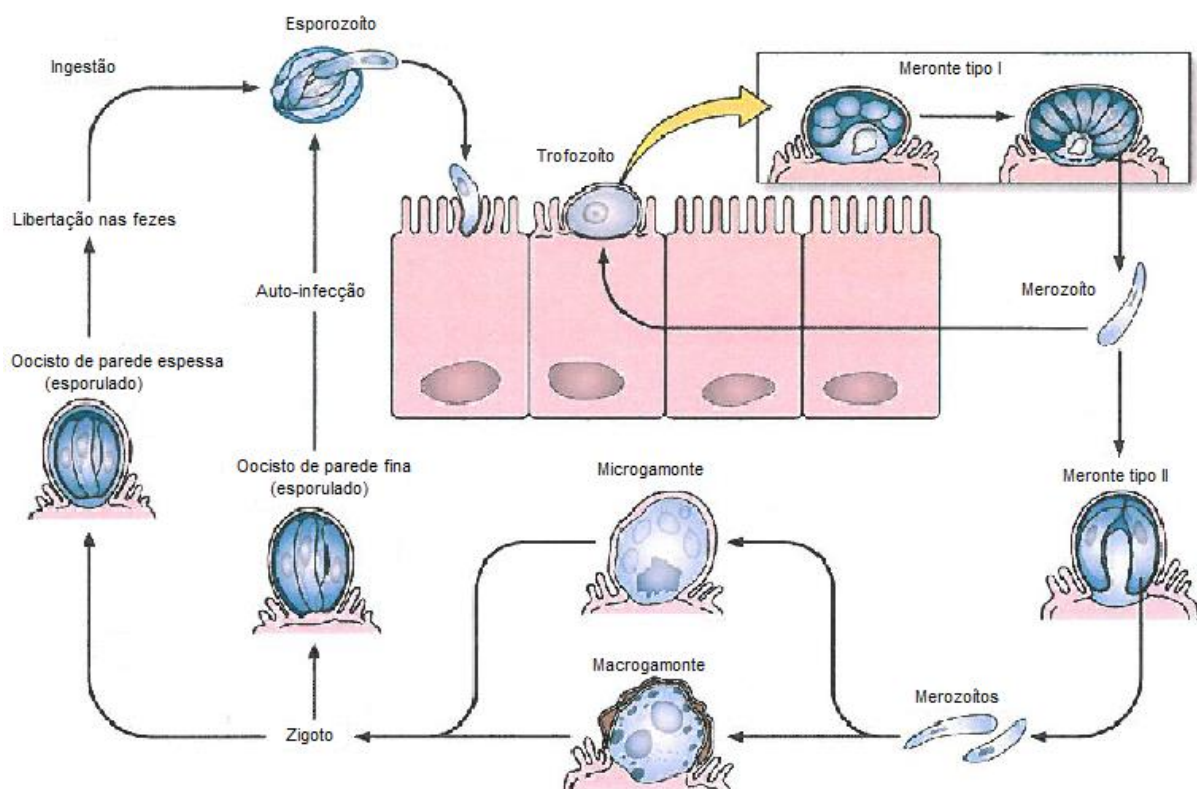
como, vesícula biliar, fígado, vias biliares, pâncreas e pulmões (Chen et al., 2002 citado por Del Cocco et al., 2009).

Outras espécies como o *C. muris* e *C. andersoni* alojam-se na mucosa gástrica, enquanto o *C. baileyi* afecta o aparelho respiratório e a cloaca do hospedeiro (Del Cocco et al., 2009).

4. CICLO DE VIDA

Todas as espécies de *Cryptosporidium* são protozoários, parasitas obrigatórios e intracelulares (Fayer et al, 2000a). O ciclo de vida é directo e monoxeno, semelhante ao de outras coccídeas entéricas, incluindo as fases de merogonia, gametogonia e esporogonia (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática do ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum* (adaptado de Bouzid, Hunter, Chalmers e Tyler, 2013).



Comparando com outras coccídias como as do género *Eimeria*, *Cryptosporidium* sp. possui um ciclo de vida com várias particularidades, importantes na dispersão da infecção e no tratamento da doença:

- (i) os oocistos podem libertar os seus esporozoítos em meios aquosos amenos sem estímulos prévios (Fayer e Leek, 1984 citado por De Graaf et al., 1999);
- (ii) a sua localização é extracitoplasmática;

(iii) duas etapas podem causar autoinfecção: os merontes tipo I e os oocistos de parede fina; (iv) os oocistos de parede espessa totalmente esporulados ao abandonarem o hospedeiro são imediatamente infectantes (De Graaf et al., 1999).

Destas particularidades resulta a extraordinária capacidade de disseminação deste parasita.

4.1 Desenquistamento

A fase endógena do ciclo começa após a ingestão do oocisto por um hospedeiro susceptível. Uma vez dentro do organismo, o primeiro passo para a infecção é a abertura da parede do oocisto num dos polos, através da qual os quatro esporozoítos deixam o oocisto e invadem e parasitam as células epiteliais do tracto gastrointestinal (Fayer, 2004; Fayer, 2008).

4.2 Invasão celular

Os esporozoítos que se libertam dos oocistos são móveis e aproximam-se do polo apical da potencial célula hospedeira e invadem-na activamente. São caracterizados pela presença de organelos secretores que se exteriorizam durante o processo de invasão (Fayer, 2008). Através do mecanismo de ligação à célula hospedeira e subsequente invasão, os esporozoítos são encapsulados por uma membrana para formar o vacúolo parasitóforo, uma estrutura comum aos Apicomplexa. O vacúolo parasitóforo do *Cryptosporidium* é único uma vez que permanece extracitoplasmático, no entanto é considerado intracelular, pois mantém a sua posição dentro do hospedeiro devido à membrana do vacúolo parasitóforo no topo das células epiteliais. Várias estruturas estão envolvidas na adesão do parasita às células hospedeiras e na formação do vacúolo parasitóforo: micronemas, róptrias e grânulos densos (O'Hara e Chen, 2011). As róptrias e os micronemas permitem a adesão e a invasão da célula hospedeira e induzem-na a envolver o parasita. Os grânulos densos apresentam proteínas que se associam ao vacúolo parasitóforo e com as estruturas vacuolares (Del Cocco et al., 2009).

Durante a internalização uma única membrana altamente invaginada forma-se entre o parasita e o citoplasma hospedeiro, formando o interface parasita-hospedeiro. À medida que o processo de invasão progride, os esporozoítos tornam-se esféricos ou ovais e são chamados de trofozoítos (Fayer, 2008).

4.3 Merogonia ou esquizogonia

A multiplicação assexuada ou merogonia resulta da divisão dos núcleos dos trofozoítos. *Cryptosporidium parvum* possui dois tipos de merontes (ou esquizontes): merontes tipo I e merontes tipo II. Os merontes tipo I desenvolvem seis ou oito núcleos, cada um é incorporado num merozoíto, um estadio estruturalmente similar a um esporozoíto. Cada merozoíto maduro

abandona o meronte para infectar outra célula hospedeira e para se diferenciar em outro meronte tipo I ou meronte tipo II. Os merontes tipo II produzem quatro merozoítos (Fayer, 2008; Del Cocco et al., 2009).

4.4 Gametogonia

Apenas os merozoítos dos merontes tipo II iniciam a reprodução sexual diferenciando-se em micro (masculinos) ou em macrogamontes (femininos). Os microgamontes tornam-se multinucleados e cada núcleo é incorporado num microgâmeta (ou microgametócito), uma célula flagelada e móvel. Os macrogamontes permanecem imóveis e uninucleados como um óvulo (Fayer, 2008; Del Cocco et al., 2009).

Desconhece-se como os microgâmetas detectam os macrogamontes. Após a fecundação do microgâmeta origina-se o ovo ou zigoto, o único estado diplóide deste ciclo que resultará no oocisto (Del Cocco et al., 2009).

4.5 Esporogonia

A esporulação dos oocistos ocorre *in situ* e quando maduros contêm quatro esporozoítos haplóides. O oocisto esporulado é o único estado exógeno documentado (Fayer, 2004) e é eliminado do tracto gastrointestinal para o meio ambiente através das fezes.

Cerca de 20% dos oocistos produzidos sofrem uma falha na formação da parede e são denominados oocistos de parede fina, libertando os seus esporozoítos na luz intestinal e sendo responsáveis pela autoinfecção do hospedeiro (Del Cocco et al., 2009). Os restantes 80% possuem parede espessa e deixam o organismo para infectar novos hospedeiros

O género *Cryptosporidium* é das poucas coccídeas cujos oocistos esporulam *in situ* seguidos de autoinfecção. A autoinfecção resulta quando as fases sexuada e assexuada do ciclo se repetem dentro do mesmo hospedeiro, começando com a libertação dos esporozoítos dos oocistos que se desenvolveram *in situ* após a esporogonia. Os oocistos de outras coccídias como *Eimeria* e *Isospora* são libertados antes da esporulação e só se tornam infectantes após esta ocorrer, formando os esporozoítos fora do organismo hospedeiro (Fayer, 2008).

4.6 Período pré-patente e patente

O período pré-patente da infecção varia consoante o hospedeiro, a espécie de *Cryptosporidium* e a dose infectante (Fayer, 2004; 2008). De acordo com dados experimentais os períodos pré-patentes (desde a ingestão dos oocistos até ao seu aparecimento na matéria fecal) variam de 3 a 6 dias para *C. parvum* em vitelos (Fayer, Gasbarre e Pasquali, 1998b) e de 4 a 22 dias nos humanos (DuPont et al., 1995), 2 a 9 dias para *C. suis* nos porcos (Enemark

et al., 2003), 10 a 12 dias para *C. bovis* nos bovinos (Fayer, Santin, Xiao, 2005), 5 a 6 dias para *C. felis* nos gatos (Iseki, 1979) e 4 a 24 dias para *C. baileyi* em galinhas (Current, Upton, Haynes, 1986).

O período patente é a duração da infecção caracterizado pelos dias de excreção dos oocistos. Varia de 1 a 12 dias para o *C. parvum* nos vitelos e 1 a 20 dias nos humanos (Fayer, 2004), 9 a 15 dias para *C. suis* nos porcos, 18 dias para *C. bovis* nos bovinos, 7 a 10 dias para *C. felis* nos gatos e até 18 dias para *C. baileyi* em galinhas (Fayer, 2008).

II. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CRIPTOSPORIDIOSE

Vários factores são responsáveis pela translocação e disseminação de *Cryptosporidium* spp.: a sua distribuição ubiquitária, a elevada resistência dos oocistos contra a inactivação física e química, o baixo número de oocistos necessários para iniciar a infecção, o elevado potencial reprodutivo e a disponibilidade de hospedeiros susceptíveis (Joachim, 2004).

1. DISTRIBUIÇÃO

As espécies do género *Cryptosporidium* são de distribuição cosmopolita (Del Cocco et al., 2009). Vários estudos têm como objectivo a distribuição da criptosporidiose em todo o mundo. De acordo com Fayer (2004, 2008) mais de 100 estudos geográficos já foram realizados em 40 países e as observações gerais são de que, os países em desenvolvimento têm taxas de infecção mais altas do que os países desenvolvidos e de que a doença é mais comum em crianças do que em adultos, e que o contacto com animais desempenha um papel importante nos países desenvolvidos.

De acordo com estudos realizados em pacientes humanos com gastroenterite, as prevalências são de 1 - 4% na Europa e América do Norte, e de 1 - 37% na Ásia, Austrália e América Central e do Sul (Rossle e Latif, 2013).

O gado doméstico é das espécies hospedeiras mais documentadas no que respeita à distribuição e prevalência de infecção por *Cryptosporidium*, pois em todo o mundo aparecem bovinos infectados com *C. parvum*. As prevalências mais elevadas têm sido identificadas em vitelos. Em ovelhas as prevalências variam entre 10 e 68%, enquanto em cabras as prevalências variam entre 11 e 35,2% (Rossle e Latif, 2013).

2. TRANSMISSÃO

O principal mecanismo de infecção do hospedeiro susceptível é a ingestão de oocistos esporulados por contacto com o hospedeiro infectado. A via de transmissão do *Cryptosporidium* é a via fecal-oral e a infecção pode ocorrer por contacto directo ou indirecto: i) de pessoa para pessoa; ii) de animal para animal; iii) de animal para o homem; iv) do homem para o animal; v) através de água ou alimentos contaminados; e vi) possivelmente pelo ar (Fayer et al., 2000a; Fayer, 2004).

Segundo Fayer et al. (2000a) as fezes depositadas no solo ficam sujeitas ao transporte dos oocistos pelo vento e pela água. Em alguns casos o Homem e os animais também contribuem para o movimento dos oocistos e os insectos também podem funcionar como hospedeiros de transporte (Clavel et al., 2002).

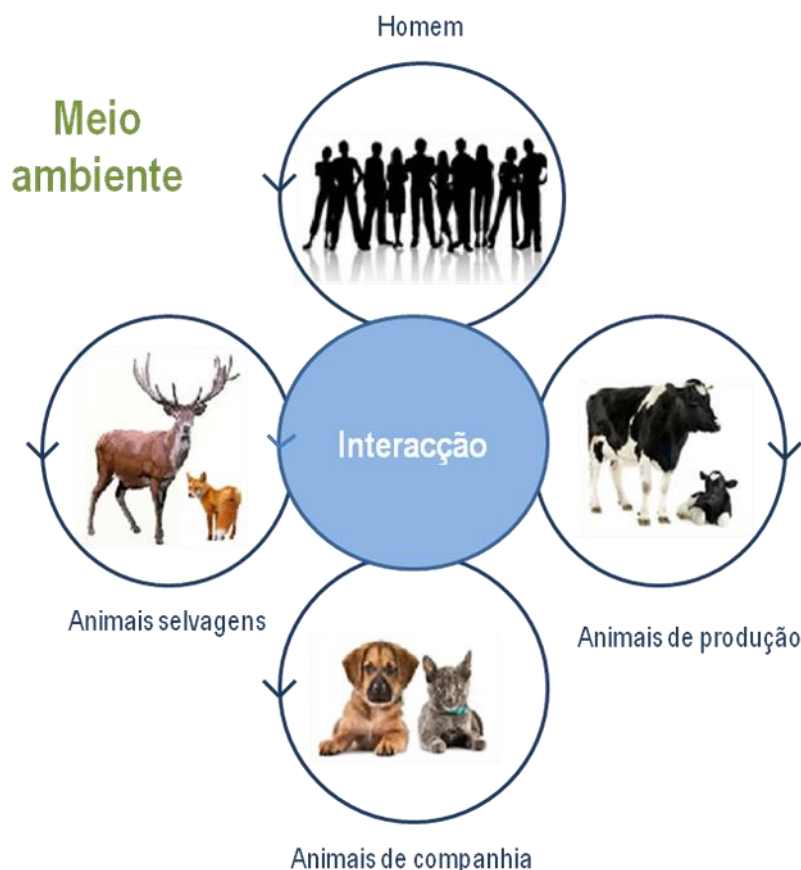
A estreita associação entre os animais de pecuária e animais silváticos facilita a transmissão de *C. parvum* entre estes hospedeiros e assegura a sua perpetuação (Fayer, 2004).

Os efluentes humanos e efluentes provenientes de vacarias são provavelmente a maior fonte de contaminação ambiental (Tzipori e Ward, 2002). É sabido que tanto animais domésticos, como animais selvagens, podem contribuir para a contaminação das águas superficiais, especialmente quando estão presentes elevados números de hospedeiros susceptíveis (neonatos) que excretam oocistos (Joachim, 2004).

Cryptosporidium é mantido numa variedade de ciclos de transmissão (figura 10) que podem operar de forma independente ou interagir e resultar em transferência zoonótica. Embora haja evidências de interação entre os ciclos, há incerteza quanto à frequência desta interação. As formas infectantes podem permanecer no ambiente e funcionar como reservatórios, no caso da água, funcionar como veículo de transmissão (Thompson, Palmer, O'Handley, 2008).

A contaminação fecal dos solos e águas superficiais pode levar à contaminação de alimentos frescos, água potável e água utilizada em actividades lúdicas. Num estudo realizado em Portugal, em águas tratadas e não tratadas de fontes superficiais e subterrâneas, das 175 amostras de água 81 amostras (46,3%) continham oocistos de *Cryptosporidium*. A espécie *C. parvum* foi a mais prevalente com 78,9%, seguido de *C. hominis* com 13,2%, *C. andersoni* com 5,3% e *C. muris* com 2,6%. De acordo com os autores a água representa um potencial veículo de transmissão da criptosporidiose tanto em humanos como em animais (Lobo, Xiao, Antunes, Matos, 2009).

Figura 10: Ciclos de transmissão do *Cryptosporidium* (adaptado de Thompson et al., 2008).



3. HOSPEDEIROS ESPECÍFICOS

A maioria das espécies de *Cryptosporidium* parece ter alguma especificidade pelo hospedeiro, mas não são estritamente específicas. *C. parvum*, aparentemente a menos específica das espécies, já foi identificada em ratos, bovinos, humanos, cavalos e em muitas outras espécies de mamíferos. Outras espécies, incluindo *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. muris*, que se pensava serem específicas das galinhas, cães, gatos, perús e ratos respectivamente, já foram conhecidas por infectar humanos e por isso também devem ser consideradas como zoonóticas (Fayer, 2004). *C. hominis* conhecido por ser específico dos humanos também foi isolado de um mamífero marinho (Morgan et al., 2000 citado por Fayer, 2004).

Estes exemplos ilustram a complexidade da tentativa de usar a especificidade do hospedeiro como uma característica para determinar as espécies.

4. IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

As espécies de *Cryptosporidium* relacionadas com formas endémicas e epidémicas da infecção no Homem são *C. hominis* e *C. parvum*. Estas espécies são responsáveis por 90% dos casos de criptosporidiose em humanos (Xiao e Feng, 2008).

Em indivíduos saudáveis a criptosporidiose é causa de diarreia aguda, aquosa e voluminosa, normalmente autolimitante. Em indivíduos imunodeprimidos a doença pode adquirir formas graves, potencialmente fatais. Pacientes afectados pela síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) são particularmente propensos a sofrer de formas graves de criptosporidiose. Outros estados de imunodepressão como, certas neoplasias (leucemias e linfomas), desnutrição grave, transplantes, quimioterapia e radioterapia ou diabetes são também predisponentes à infecção por *Cryptosporidium* (Del Cocco et al., 2009). As crianças também constituem uma população de risco. Nos países desenvolvidos casos esporádicos de criptosporidiose em crianças estão relacionados com a ausência de hábitos de higiene, próprios da idade (Tzipori e Ward, 2002; Joachim, 2004).

C. parvum é considerada a espécie com maior potencial zoonótico e os vitelos por desmamar são o seu principal reservatório. Estes animais têm sido identificados como os agentes causais de surtos de criptosporidiose transmitida pelo consumo de água e alimentos contaminados. Outras espécies zoonóticas como *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. canis*, *C. felis* e os genótipos de cavalo, coelho e burro têm desencadeado infecções em humanos, geralmente associadas ao contacto directo com o hospedeiro (Caccio, Thompson, McLauchlin e Smith, 2005).

A criptosporidiose é considerada uma antropozoonose e as fontes de contaminação certamente variam, dependendo do clima, da densidade populacional, das práticas de agricultura e dos padrões de higiene no que diz respeito ao manuseamento de águas residuais e ao processamento de comida, em cada área geográfica (Joachim, 2004).

A água é considerada o principal vector para *Cryptosporidium* spp. (Joachim, 2004). A contaminação da água de bebida e recreacional com oocistos de *Cryptosporidium* representa a principal fonte de infecção para o Homem. A elevada contaminação de águas superficiais e subterrâneas, a notável resistência dos oocistos ao tratamento com cloro e seus derivados e a ineficácia dos filtros utilizados na potabilização da água são factores que contribuem para o desencadeamento de surtos de criptosporidiose em humanos.

O gado bovino tem sido considerado como uma importante fonte de criptosporidiose zoonótica desde 1980. A contaminação de comida e água com dejetos provenientes da

produção de gado é identificada como a causa de vários surtos de criptosporidiose em humanos (Xiao e Feng, 2008).

Só nos Estados Unidos a produção de dejetos provenientes do gado bovino, em 1997, foi estimada em 1,2 bilhões de toneladas. Porque quase todos os vitelos pré-desmamados se tornam infectados e excretam elevado número de oocistos nas fezes, e os animais mais velhos continuam a excretar oocistos ao longo da vida, acredita-se que o gado bovino seja a principal fonte de contaminação da água (Fayer, 2004).

O surto ocorrido em 1993 em Milwaukee nos Estados Unidos, é conhecido como um dos surtos mais importantes relacionados com o consumo de água contaminada, afectou mais de 400 000 pessoas, entre as quais pacientes imunocomprometidos que desenvolveram formas graves da infecção (MacKenzie et al., 1994).

Para além das infecções através do consumo de água contaminada, o contacto directo com animais de produção e o estreito contacto entre humanos em pobres condições de higiene também favorecem a transmissão desta parasitose (Joachim, 2004).

O contacto com vitelos infectados também já foi implicado como causa de vários pequenos surtos de criptosporidiose em estudantes de veterinária, técnicos ligados à produção animal e em crianças (Xiao e Feng, 2008).

Um estudo realizado na Escócia em doentes com criptosporidiose demonstrou que *C. parvum* era o agente causal em 84% num total de 67 casos, suportando a ideia de que a poluição fecal das fontes de água, originada na produção animal, é a principal causa de criptosporidiose humana esporádica (Goh et al., 2004 citado por Thompson et al., 2008).

Em Portugal Alves et al. (2003) estudaram a distribuição de genótipos de *Cryptosporidium* em 29 amostras de fezes de pacientes com SIDA, 16 eram de *C. parvum*, 7 de *C. hominis*, 3 de *C. meleagridis* e 3 de *C. felis*. Ainda de acordo com Alves (2006) a caracterização molecular de isolados humanos de *Cryptosporidium* spp., detectados entre 1994 e 2005, permitiu identificar, ao nível da espécie, 51 parasitas: 52,9% (27/51) pertenciam à espécie *C. parvum*, 31,4% (16/51) a *C. hominis*, 9,8% (5/51) a *C. felis* e 5,9% (3/51) a *C. meleagridis*.

Na Europa, os casos de infecção por *Cryptosporidium* em humanos são relativamente limitados. Em países em que os casos confirmados são reportados às agências de saúde pública as incidências podem ser estimadas. Contudo, os números actuais de infecção podem ser consideravelmente mais altos devido à falta de diagnóstico.

III. CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA

A infecção por *Cryptosporidium* em bovinos foi reportada pela primeira vez nos anos 1970 por Panciera et al. (1971). Contudo, devido à sua associação com outros vírus e bactérias enteropatogénicas o seu papel como agente principal foi negligenciado até 1980, quando Tzipori, Campbell, Sherwood, Snodgrass e Whitelaw (1980) definiram o protozoário do género *Cryptosporidium* como causa principal de um surto de diarreia neonatal em bovinos.

A Criptosporidiose é uma importante causa de perdas económicas nos animais de produção e ganhou importância veterinária desde que o gado bovino se tornou uma significativa fonte de infecção para os humanos. A grande quantidade de oocistos eliminados durante a infecção é responsável por assegurar o elevado nível de contaminação ambiental e o gado bovino é conhecido como potencial causa de contaminação de águas superficiais (De Graaf et al., 1999).

1. ESPÉCIES QUE AFECTAM OS BOVINOS

Embora as infecções por *C. parvum* já tenham sido relatadas em muitas espécies de mamíferos diferentes, a maioria dos hospedeiros frequentemente relatados e mais amplamente conhecidos para além dos humanos são os ruminantes. De todas as espécies de ruminantes selvagens e domésticos estudados, o *Bos taurus*, que inclui todas as raças de gado doméstico europeias, é o que mais exaustivamente foi estudado (Fayer et al., 1998b).

Hoje em dia os bovinos são conhecidos como hospedeiros principais e podem ser infectados com quatro espécies de *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* e *Cryptosporidium andersoni* (Santin et al., 2004; Fayer, Santin, Trout, 2007, 2008).

Cryptosporidium parvum é a espécie mais estudada e a principal responsável por doença entérica nos bovinos, sendo responsável por 85% das infecções causadas por *Cryptosporidium* sp. em vitelos antes do desmame (Feng et al., 2007). Esta espécie coloniza o íleo e as porções proximais do intestino grosso, mas as lesões também se podem encontrar no cego, colon e ocasionalmente no duodeno (Sanford e Josephson, 1982). *C. parvum* é causa comum de diarreia em vitelos entre duas e três semanas de idade, a excreção de oocistos pode ter início aos três dias o que pode significar a susceptibilidade dos vitelos à infecção logo após o nascimento. A infecção possui um período pré-patente de 3 a 6 dias e um período patente de 4 a 17 dias (Fayer et al., 1998b).

A infecção por *Cryptosporidium andersoni* atinge principalmente bezerros desmamados, novilhas e gado adulto e é encontrado principalmente no abomaso. As infecções persistem por muitos anos (Lindsay et al., 2000) e os animais infectados são fonte de oocistos para outros animais (Kvac, Kouba e Vitovec, 2006). A sua presença no gado bovino ocorre mundialmente e tem sido sempre associado a vitelos desmamados ou adultos mas com taxas de infecção e intensidades baixas (Fayer et al., 2000b; Lindsay et al., 2000). Num estudo realizado por Kvac et al. (2006) as prevalências em vitelos por desmamar e vitelos desmamados variaram entre 0 e 9,6% e 0 e 35,5% respectivamente. A prevalência da infecção é geralmente baixa em bovinos adultos no entanto também existem estudos que apontam uma prevalência de 65% (Fayer et al., 2007) e 43,8 % (Kvac e Vitovec, 2003) em vacas adultas. Os oocistos de *C. andersoni* possuem 6,0-8,1 x 5,0-6,5 µm de dimensão e forma elipsoidal (Lindsay et al., 2000). De acordo com Kvac e Vitovec (2003) o período patente da infecção nos vitelos começa por volta das 5-6 semanas.

Cryptosporidium bovis afecta vitelos entre 2 e 7 meses de idade. O período pré-patente é de 10 dias e o período patente é de 18 dias. Os oocistos de *C. bovis* medem em média 4,89 x 4,63 µm. Não está associado a sinais clínicos de enterite, nem constitui perigo zoonótico (Fayer et al., 2005). Parece ser altamente prevalente em vitelos desmamados (Santin, Trout, Fayer, 2008), mas não em outras espécies (Fayer, 2010).

Cryptosporidium ryanae, anteriormente identificado como *Cryptosporidium* genótipo deer-like, é prevalente nos bovinos em todo o mundo. O seu período pré-patente é de 11 dias e o período patente de 15 a 17 dias, a infecção afecta o intestino delgado e não apresenta sinais clínicos. Apresenta prevalências de 2% em vitelos antes do desmame e de 7,6% em vitelos desmamados. Não existem outros hospedeiros conhecidos para esta espécie (Fayer et al., 2008; Fayer, 2010).

2. EPIDEMIOLOGIA

O *Cryptosporidium* spp. possui características que influenciam bastante a epidemiologia da infecção nos bovinos: a) é mantido numa variedade de ciclos de transmissão que podem ser preservados independentemente; b) os animais infectados podem excretar uma grande quantidade de oocistos imediatamente infectantes para os hospedeiros susceptíveis e responsáveis pela contaminação ambiental; c) os oocistos são muito estáveis e podem sobreviver por semanas ou meses no ambiente; d) a sua transmissão zoonótica pode ocorrer através da água ou alimento; e) os oocistos são resistentes aos desinfectantes convencionais; f) não existe tratamento eficaz contra este protozoário (Smith et al., 2007).

Os vitelos são conhecidos como a principal fonte de infecção dentro de uma exploração. Os vitelos geralmente infectam-se entre a primeira e a quarta semana de idade e a duração da infecção é curta, durando cerca de duas semanas (O'Handley et al., 1999). Os vitelos podem iniciar a excreção de oocistos aos 2 dias de idade e o pico de excreção ocorre por volta dos 14 dias (Olson, O'Handley, Ralston, McAllister, Thompson, 2004). Uma vez infectados, o total de oocistos excretados pode atingir $2,5 \times 10^{10}$ oocistos por vitelo por infecção, permitindo uma rápida contaminação das áreas circundantes (Atwill et al., 1998).

Apesar da excreção de oocistos ser menor nos animais adultos, as mães têm sido apontadas como fonte de infecção para os vitelos recém-nascidos, facto baseado num aumento da excreção de oocistos (OPG) no periparto. Faubert e Litvinsky (2000) obtiveram uma média de 500 OPG na altura do parto e números relativamente inferiores de 100-250 OPG e 260 OPG no período pré-parto e pós-parto respectivamente. Assumindo que as mães excretam elevado número de oocistos durante o parto, isto é uma considerável fonte de infecção para os recém-nascidos. Outros autores, no entanto, não confirmaram este aumento de excreção de oocistos no periparto (Atwill et al., 1998; Atwill e Pereira, 2003).

A produção de gado, especialmente em áreas onde os vitelos são mantidos na pastagem, pode contribuir para o aumento da contaminação de águas superficiais, principalmente nos períodos de chuvas intensas e em áreas de elevado declive (Joachim, 2004), as águas de escorrência de pastagens contaminadas aumenta a carga de oocistos presente nos cursos de água como rios e ribeiras. Os dejectos contaminados provenientes das vacarias e utilizados na fertilização dos terrenos agrícolas também contribuem para o risco de infecção dos animais.

Os principais factores de risco associados à infecção do gado através de água ou alimento contaminados são:

- Utilização de estrume e chorume contaminados na fertilização das culturas;
- Utilização de água proveniente de cursos de água contaminados (ex: abeberamento dos animais, lavagem das instalações, irrigação das culturas);
- Utilização de águas residuais contaminadas na irrigação das culturas;
- Pastoreio de animais infectados junto a áreas cultivadas e a cursos de água.

As principais medidas de prevenção para reduzir a infecção do gado através de água ou alimento contaminados são:

- Se possível, instalações afastadas dos cursos de água e lagoas;
- Vedação entre as zonas de pastagem e os cursos de água para prevenir a contaminação directa;
- Tratamento de dejectos e águas residuais provenientes das vacarias.

3. DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA

Os bovinos são a espécie primária, depois dos humanos, a ser afectada pela criptosporidiose. Desta foram, mais estudos de prevalência têm sido conduzidos nos bovinos, do que nas outras espécies. Numa variedade de estudos efetuados por todo o mundo, as prevalências encontradas para os bovinos variam de zero a 100%. Tipicamente as prevalências são mais elevadas em animais jovens quando comparadas com animais mais velhos (Santin e Trout, 2008).

A ocorrência de *Cryptosporidium* sp. nos bovinos está relacionada com a idade e de acordo com Fayer et al. (2007) as prevalências diminuem com a idade dos animais desde vitelos por desmamar, a vitelos desmamados, a novilhas e a vacas adultas. *Cryptosporidium parvum*, a espécie mais prevalente, é responsável por cerca de 85% das infecções em vitelos antes do desmame e cerca de 1% das infeções em vitelos desmamados e novilhas. Os vitelos após o desmame e as novilhas, são mais infectados por *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* (Santin et al., 2004; Fayer, Santin, Trout, Greiner, 2006).

De acordo com Santin et al. (2008) num estudo realizado em vitelos com idades entre o dia do nascimento e os 24 meses a prevalência de *Cryptosporidium* em vitelos antes do desmame foi superior (45,8%) à encontrada em vitelos após o desmame (18,5%). Ainda nos EUA Santin et al. (2004) obtiveram prevalências de 100% em vitelos antes do desmame nas explorações leiteiras estudadas e Garber, Salman, Hurd, Keefe e Schlater (1994) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 59,1% das explorações estudadas e em 22,4% dos vitelos testados. No Canadá prevalências de 40,6% e 78% foram obtidas em vitelos infectados com *C. parvum* (Trotz-Williams, Jarvie, Martin, Leslie e Peregrine, 2005; Trotz-Williams et al., 2007).

Na região de Buenos Aires, Argentina, foi relatada uma prevalência de infecção por *Cryptosporidium* sp. de 17%, em que 100% dos vitelos infectados tinham menos de 14 dias de idade (Del Cocco, Córdoba, Basualdo, 2008). No Brasil, Júnior, Carvalho, Rocha e Guimarães (2011) obtiveram uma prevalência de 21,62% em vitelos com idades compreendidas entre os 7 e os 21 dias.

Num estudo realizado em França para determinar o papel do *C. parvum* nas diarreias neonatais 16,8% dos vitelos excretavam oocistos no primeiro dia do estudo, esta percentagem aumentou para 23% e 51,8% no dia 3 e no dia 8 respectivamente. Todos os animais tinham entre 8 e 15 dias de idade (Naciri, Lefay, Mancassola, Poirier, Chermette, 1999).

Em Inglaterra, Brook, Hart, French e Christley (2008) obtiveram 28% de prevalência em vitelos não desmamados e em Espanha de acordo com Castro-Hermida, González-Losada e Ares-Mazás (2002a) a prevalência foi de 47,9% em vitelos com menos de 21 dias e segundo

De la Fuente et al. (1999) a prevalência, em vitelos com idade entre 8 e 14 dias e entre 15 e 21 dias de idade, foi de 71,9% e 63,2% respectivamente.

Em Portugal, Mendonça et al. (2007) obtiveram uma prevalência de 25,4% em vitelos, o mesmo estudo mostrou através da caracterização molecular que todos os isolados eram de *C. parvum*. Outro estudo realizado no noroeste de Portugal obteve uma prevalência de 74,8% em vitelos até 12 semanas de idade. No mesmo estudo as prevalências por exploração variaram entre 25% e 100% e as percentagens mais elevadas de excreção de oocistos foram obtidas em vitelos com idades entre 7 e 14 dias (89%) e 15 e 21 dias (90%) (Martins, Madeira de Carvalho, Bacelar e Cannas da Silva, 2007). Ainda em Portugal, um estudo realizado em explorações leiteiras do Norte, Centro e Sul de Portugal Continental e Açores obteve uma proporção global da infecção de 71,8% (Pereira da Fonseca e Cannas da Silva, 2000).

De acordo com alguns autores a prevalência de *Cryptosporidium* em novilhas e vacas adultas é geralmente mais baixa que em vitelos por desmamar. Nos EUA prevalências variaram entre 11,9% e 2,2% em novilhas (Fayer et al., 2006, Santin et al., 2008). Na Dinamarca foi registada uma prevalência de 16% em vacas adultas (Madox-Hyttel, Langkjae, Enemark, Vigre, 2006). Segundo os mesmos estudos o *C. parvum*, a espécie zoonótica, esteve presente em menor percentagem, 0,7% (Fayer et al., 2006) e 0% (Santin et al., 2008), que as outras espécies e consequentemente o risco de infecção humana por contacto com estes animais parece ser menor do que com o contacto com vitelos jovens.

Embora seja considerada uma infecção comum em todos os ruminantes recém-nascidos, o *C. parvum* é muito mais comum em animais de explorações leiteiras que em animais de explorações de carne (O’Handley e Olson, 2006). Estudos realizados na Europa indicam que a prevalência em vitelos de carne é significativamente menor que em vitelos de leite quando alojados sob condições semelhantes (Kvac et al., 2006). No entanto, em Portugal a pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em novilhos de explorações de carne revelou uma prevalência média de 82%. Embora os animais não manifestassem sintomas, não deixavam de constituir uma importante fonte de contaminação ambiental e de infecção para os vitelos (Cardoso, 2010).

A maioria dos estudos mede uma prevalência pontual em que apenas uma amostra é colhida por animal, numa determinada exploração, em determinado tempo. Estes contudo, tendem a subestimar a verdadeira prevalência numa população, uma vez que podem perder o período patente da excreção de oocistos e porque a excreção pode ser intermitente. Um menor número de estudos longitudinais detecta prevalências cumulativas ao longo do tempo para múltiplas amostras colhidas do mesmo animal, contudo, envolvem mais tempo e maiores esforços financeiros e logísticos (Santin e Trout, 2008).

4. VIAS DE TRANSMISSÃO

Os representantes do género *Cryptosporidium* utilizam como via de transmissão a via fecal-oral. Os vitelos infectam-se pela ingestão de oocistos esporulados, e uma baixa dose de oocistos é suficiente para provocarem infecção. A transmissão fecal-oral pode ocorrer nos vitelos de forma directa ou indirecta.

A) Transmissão directa

A transmissão directa ocorre através do contacto directo entre vitelos infectados e vitelos susceptíveis. As mães também são consideradas fonte directa de infecção para os vitelos logo após o nascimento, uma vez que a contaminação dos úberes favorece a transmissão.

B) Transmissão indirecta

A transmissão indirecta pode ocorrer pela ingestão de água ou alimentos contaminados e pelo contacto com superfícies e ambientes contaminados que servem de reservatórios aos oocistos. A transmissão mecânica através de fomites como instrumentos, baldes e tetinas contaminados, ou mesmo hospedeiros de transporte como artrópodes ou pássaros, também é possível (Fayer et al., 2000a). Os tratadores também podem funcionar como agentes de disseminação da doença através de botas e roupas conspurcadas.

5. FACTORES DE RISCO

5.1 Idade

De acordo com Brook et al. (2008) os vitelos com idade compreendida entre 8 e 21 dias possuem um maior risco de infecção quando comparados com vitelos de outras idades. Um estudo elaborado por Duranti et al. (2009) mostrou que o maior risco de infecção por *C. parvum* surge na segunda semana de vida. Estes animais representam um importante reservatório de infecção nas explorações e podem também representar um risco para a saúde pública, assumindo que as espécies ou genótipos que excretam são zoonóticos. O risco de infecção diminui com a idade dos animais (Mohammed, Wade, Schaaf, 1999). Quanto mais novos os vitelos adquirirem a infecção mais longo será o período de excreção de oocistos (Castro-Hermida, González-Losada, Mezo-Menendez, Ares-Mazas, 2002b).

5.2 Infecções concomitantes

A doença entérica é um importante problema de saúde nos vitelos e a diarreia está associada à redução do ganho de peso e ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade entre os animais jovens. A etiologia da diarreia neonatal bovina é multifactorial e pode resultar da interacção entre diversos factores como: o animal, o ambiente, o manejo, a nutrição e agentes infecciosos. Agentes como *Escherichia coli* (ECET), *Salmonella*, Coronavírus, Rotavírus e o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD) são reconhecidos internacionalmente como os mais importantes agentes enteropatogénicos da diarreia aguda nos vitelos (Martins et al., 2007; Madeira de Carvalho et al., 2011).

5.3 Proximidade a cursos de água

A proximidade das instalações pecuárias e o pastoreio dos animais junto aos cursos de água pode ser considerado como uma potencial fonte de contaminação das águas superficiais. De acordo com Pereira da Fonseca (2000) a água de abeberamento dos animais constitui um importante meio de disseminação, a mesma autora obteve uma prevalência de 55% (6/11) na pesquisa de oocistos em amostras de água de bebida fornecida aos animais.

5.4 Tamanho do rebanho

De acordo com vários autores existe uma associação entre uma elevada densidade de animais e o risco de infecção por *Cryptosporidium* (Quigley et al., 1994; Garber et al., 1994).

Esta associação pode ser explicada pelo facto de rebanhos maiores produzirem maior número de vitelos que poderão contrair a infecção, contribuindo para um aumento da contaminação ambiental (Mohammed et al., 1999). A introdução constante de vitelos recém-nascidos que acontece muitas vezes nas grandes explorações, cria a condição ideal para manter um elevado grau de infecção endémica nestas explorações (Atwill et al., 1998; Atwill, Jonhson e Pereira, 1999b).

5.5 Época de partos

A época de partos tem sido associada a surtos de Criptosporidiose. Huetink, van der Giessen, Noordhuizen e Ploeger (2001) obtiveram prevalências e picos de excreção de oocistos de 22,2% em Dezembro e 2,4% em Junho. Outros autores reportaram variações sazonais com pico de excreção de oocistos na Primavera (Atwill et al., 1999a) e outros com picos de excreção no Inverno (Mohammed et al., 1999; Garber et al., 1994). Estas variações parecem estar relacionadas com altura do ano em que há maior número de nascimentos de vitelos nas explorações. O prolongamento da época de partos também resulta na introdução prolongada

de animais susceptíveis (vitelos recém-nascidos) o que ajuda a manter a excreção activa de oocistos nos rebanhos (Atwill et al., 1999b).

5.6 Tipo de alojamento

As instalações, sobretudo os alojamentos dos vitelos, devem ser consideradas como fontes de transmissão indirecta. Em alojamentos colectivos o contacto directo entre os vitelos favorece a transmissão de *Cryptosporidium* (Castro-Hermida et al., 2002a), mas os alojamentos individuais também permitem a transmissão, quer por fomites, como baldes, tetinas ou tratadores contaminados, quer por efluentes de material fecal. A transmissão a vitelos subsequentes numa determinada jaula é possível (O'Handley et al., 1999).

Um estudo conduzido nos EUA, por Mohammed et al. (1999) relata que bezerros criados no exterior possuem cinco vezes menos probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* do que aqueles criados em confinamento. O mesmo autor demonstrou que os locais de confinamento podem ser uma fonte importante de manutenção do parasita, uma vez que a ventilação e os raios solares geralmente são restritos nestes casos. De uma forma geral, vitelos alojados em boxes no interior possuem maior risco de infecção que vitelos alojados em casotas no exterior (Quigley et al., 1994).

Figura 11: Diferentes tipos de alojamento ou contenção dos vitelos. **A)** À corda no exterior. **B)** Em grupo no interior. **C)** Em grupo no exterior. **D)** Boxes individuais no interior (Fonte: original).



5.7 Tipo de piso

Mohammed et al. (1999) relatam que bezerros recém-nascidos criados em alojamentos de cimento possuíam três vezes menos hipóteses de estarem infectados, em comparação aos animais alojados em locais construídos com outros tipos de material.

De acordo com outros autores o risco de infecção é 66% mais elevado em vitelos alojados em boxes de chão de palha ou terra do que em vitelos alojados em boxes com chão de cimento (Castro-Hermida et al., 2002a). Ainda de acordo com Muhid, Robertson, Ng e Ryan (2011) vitelos alojados em chão de ripado possuem sete vezes mais hipótese de infecção com *Cryptosporidium*. O tipo de chão está também directamente relacionado com a frequência e tipo de limpeza, uma vez que pisos de cimento são mais facilmente laváveis que os pisos de outro material (Muhid et al., 2011).

5.8 Espessura da cama

A espessura da cama é também um factor associado à infecção. De acordo com Brook et al. (2008) vitelos com camas de espessura entre 11 e 15 cm possuem menor risco de infecção em relação a vitelos com camas de 0-5 cm de espessura. Camas muito esparsas não são suficientes para manter as condições de higiene ideais e podem resultar num elevado nível de contaminação ambiental que não acontece em camas mais espessas.

A pouca espessura da cama também pode ser um indicador para outras más práticas de manejo e higiene. A palha além de ser cara, a sua substituição é morosa e trabalhosa (Brook et al., 2008).

5.9 Lavagem e desinfecção

A frequência de limpeza e a desinfecção das instalações em que se alojam os vitelos são importantes do ponto de vista do risco de infecção por *Cryptosporidium*.

Segundo Castro-Hermida et al. (2002a) vitelos alojados em boxes não desinfectadas possuem 62% mais risco de infecção, quando comparados com vitelos alojados em boxes que foram desinfectadas. De acordo com o mesmo autor nas explorações em que os alojamentos são limpos mensalmente, os vitelos estão duas vezes mais susceptíveis à infecção, que os vitelos de explorações que limpam diariamente os seus alojamentos.

A adição de cama limpa e a eliminação diária de cama suja também diminui significativamente o risco de infecção com *C. parvum* (Mohammed et al., 1999). E a limpeza das instalações com jacto de água a alta pressão entre diferentes lotes de animais, tem um efeito preventivo contra elevados níveis de excreção de oocistos (Madox-Hyttel et al., 2006).

Explorações que praticam a desinfecção dos utensílios de alimentação possuem baixas prevalências de infecção por *Cryptosporidium* (Muhid et al., 2011).

5.10 Separação dos vitelos após o nascimento

O papel das maternidades depende essencialmente do tempo de permanência do vitelo com a mãe antes da sua separação, e do número de vacas por maternidade (Garber et al., 1994).

Em relação á separação dos vitelos da mãe após o nascimento, as opiniões dividem-se. De acordo com Duranti et al. (2009) explorações em que os vitelos são imediatamente separados das mães e mantidos em alojamentos individuais ou colectivos, apresentavam maior prevalência de infecção por *Cryptosporidium* que explorações em que os vitelos foram mantidos com as mães nos primeiros dias de vida. Os vitelos deixados com as mães parecem constituir uma relação que funciona como um factor protetor, uma vez que permite uma ingestão contínua e prolongada de anticorpos maternos através do colostro nos primeiros dias e a ingestão contínua de leite materno antes do desmame.

Pelo contrário, num estudo conduzido por Quigley et al. (1994) o risco de criptosporidiose foi superior nas explorações em que os vitelos foram amamentados pelas mães, pois de acordo com os mesmos autores, os vitelos deixados com a mãe por 72 horas podem estar expostos a um grande número de agentes infecciosos relacionados com o ambiente da mãe, aumentando o risco de infecção.

5.11 Administração de colostro

A importância do consumo adequado de colostro durante as primeiras 24 horas de vida e o seu impacto na morbilidade e mortalidade dos vitelos é bem conhecido.

O fornecimento de colostro fresco está significativamente associado com a diminuição do risco de infecção com o *C. parvum*, quando comparado com o uso de colostro fermentado ou congelado (Mohammed et al., 1999).

Também a quantidade de colostro fornecido aos vitelos nas primeiras 24 horas de vida está positivamente relacionado com o risco de excreção de *C. parvum* (Trotz-Wiliams et al., 2007).

De acordo com Júnior et al. (2011), o fornecimento de colostro após as seis primeiras horas de nascimento do bezerro aumentou em duas vezes o risco de infecção por *Cryptosporidium*.

5.12 Administração de leite de substituição

A diminuição do risco de infecção parece estar associada a uma alimentação à mão com leite de substituição. A alimentação à mão elimina o contacto entre o bezerro e a vaca, e o tempo

que o bezerro permanece na área de maternidade, de modo que o risco de transmissão de infecção é reduzido (Mohammed et al., 1999).

Por outro lado, de acordo com Muhid et al. (2011) é possível que o leite possa ser contaminado devido a garrafas e tetinas contaminadas, ou durante o processo de ordenha.

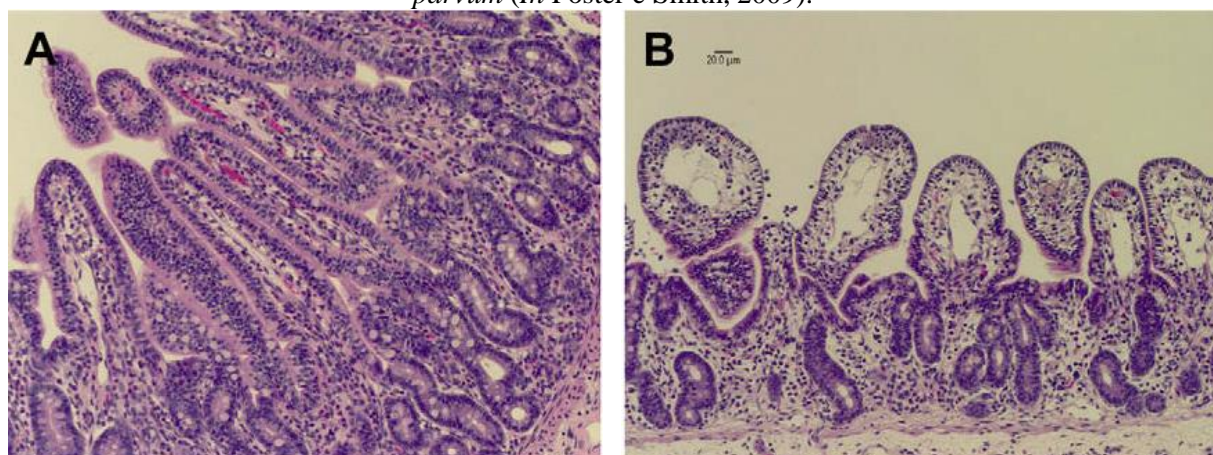
6. PATOGENIA E SINAIS CLINICOS

As espécies intestinais de *Cryptosporidium* dos bovinos, *C. bovis* e o *C. parvum*, completam o seu ciclo de vida no ileo, e ocasionalmente no colon, cego e duodeno (Sanford e Josephson, 1982). A patogenicidade de *C. bovis* acredita-se ser limitada, provavelmente devido à imunidade nos animais mais velhos (Harp, Woodmansee, Moon, 1990; Santin et al., 2004).

Nos vitelos mais jovens *C. parvum* é predominante e é considerado altamente patogénico. A invasão e colonização da superfície epitelial pelos diferentes estádios parasitários, resultam na perda de células epiteliais e da bordadura em escova das microvilosidades. Além disso, as junções epiteliais são destruídas levando a um aumento da permeabilidade epitelial. Como consequência há uma diminuição da área superficial do intestino, perda de enzimas digestivas de membrana, como a lactase, e um deficiente transporte de nutrientes e electrólitos. (Sanford e Josephson, 1982).

A infecção resulta na atrofia e fusão das vilosidades intestinais, hiperplasia das criptas, ruptura das microvilosidades intestinais e infiltração de células inflamatórias mononucleares e neutrófilos na lâmina própria. O culminar destas alterações patológicas é o desenvolvimento de diarreia por má absorção (O'Handley e Olson, 2006; Fayer et al., 1998b).

Figura 12: Mucosa intestinal de vitelo. **A)** Mucosa normal. **B)** Lesões da mucosa infectada por *C. parvum* (In Foster e Smith, 2009).



O *Cryptosporidium* ao nível abomasal invade as glândulas peptídicas e pilóricas causando dilatação das glândulas, hipertrofia da mucosa gástrica e aumento da espessura do epitélio (O’Handley e Olson, 2006). Funcionalmente, isto leva à diminuição da digestão proteica, aumentando o pH gástrico e inibindo a função proteolítica (Anderson, 1987). As alterações histopatológicas no local da infecção no abomaso possuem carácter não inflamatório e incluem dilatação das zonas infectadas das glândulas com atrofia e metaplasia do epitélio glandular, activação das células globosas e hiperprodução de muco (Kvác e Vitovec, 2003).

As principais manifestações clínicas de *C. parvum* nos bovinos são diarreia secretória e de má absorção, depressão, anorexia e dor abdominal. Estes sinais tornam-se evidentes 3 a 5 dias após a infecção e a sua duração pode variar entre 4 e 18 dias (O’Handley e Olson, 2006; Fayer et al., 1998b).

A gravidade e duração são altamente variáveis entre os vitelos dependendo também de infecções concomitantes virais, bacterianas e parasitárias. A diarreia, amarelada pálida, aquosa ou com muco, pode ser moderada a grave e pode durar até duas semanas. Os vitelos apresentam letargia, anorexia e desidratação. Nos casos mais severos os vitelos morrem de desidratação, acidose metabólica e colapso cardiovascular (O’Handley & Olson, 2006). Os vitelos com criptosporidiose grave podem levar quatro a seis semanas a recuperar completamente, e pode haver um impacto inicial negativo na produção devido a perda de peso ou diminuição do ganho diário (Olson et al., 2004).

As taxas de mortalidade da criptosporidiose são altamente variáveis (De Graff et al., 1999). Em rebanhos endémicos as taxas de morbilidade chegam aos 100% mas a mortalidade é raramente observada (Thompson et al., 2008; Santin et al., 2008). Em rebanhos de carne já se observaram taxas de mortalidade de 30% associadas à introdução de vitelos de leite (Olson et al., 2004).

Figura 13: Vitelo com diarreia aquosa (Fonte: original).



As infecções por *C. andersoni* não causam diarreia, mas os animais infectados podem excretar oocistos durante vários meses (OIE, 2008). Estas seguem um percurso mais crónico com a produção de menor número de oocistos em relação às infecções com *C. parvum* (Kvac e Vitovec, 2003). No trabalho de campo realizado por Kvac e Vitovec (2003) durante o decorrer do estudo nenhum dos animais testados mostrou sinais clínicos de doença. No entanto, as infecções por *C. andersoni* podem causar comprometimento moderado a severo do ganho de peso, diminuição da eficiência alimentar em *feedlots* e redução da produção de leite em explorações leiteiras (Anderson, 1987).

Apesar disso, as infecções por *Cryptosporidium* sp. são geralmente autolimitantes, os ruminantes desenvolvem imunidade após infecção inicial e na maioria dos casos os sinais clínicos são moderados (O'Handley & Olson, 2006).

Infecções com as espécies *C. bovis* e *C. ryanae* adaptadas aos bovinos não têm sido associadas a doença clínica (Fayer et al. 2005, 2008). Não existe informação histológica ou estudos de patologia subclínica nestas espécies (Santin, 2013).

7. FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA

A infecção por *C. parvum* em vitelos jovens conduz à atrofia grave das vilosidades e à redução da área total da superfície da mucosa intestinal, devido à perda de células epiteliais. A hiperplasia das criptas também ocorre de forma a compensar a perda dos enterócitos. Existem dois potenciais mecanismos para o aumento da perda de células epiteliais nas infecções por *C. parvum* (Foster e Smith, 2009). O primeiro é o efeito citotóxico direto do organismo na mucosa intestinal e o segundo é a apoptose. Independentemente do mecanismo a consequência é sempre diarreia por má absorção.

A rede de absorção de fluidos baseia-se no movimento do sódio nas vilosidades e na secreção de aniões nas criptas intestinais. Desta forma a absorção é diminuída devido à perda de epitélio intestinal e seus transportadores. A absorção de água e sódio acoplado com glucose ou aminoácidos neutros (ex. glutamina), pode continuar a ocorrer, mas é limitada, o que pode ser usado para melhorar a absorção. No entanto, a absorção total de hidratos de carbono, lípidos e aminoácidos é reduzida. Esta má absorção conduz ao aparecimento de diarreia que pode ir de moderada a grave, dependendo da dose do organismo infectante e de coinfeções com outros agentes patogénicos (Foster e Smith, 2009).

Além da má absorção, a secreção nas criptas de Cl^- e HCO_3^- e a inibição da absorção de NaCl pelas vilosidades é mediada pela síntese aumentada de prostaglandinas (PGI_2 , PGE_2) da

mucosa. Estas alterações iónicas contribuem para a diarreia e perda de fluídos na criptosporidiose, com a PGE₂ actuando directamente nos enterócitos e a PGI₂ actuando no sistema nervoso entérico (Foster e Smith, 2009; Gookin, Nordone, Argenzio, 2002).

8. MECANISMOS DE DEFESA CONTRA A INFECÇÃO POR *CRYPTOSPORIDUM*

A criptosporidiose é sobretudo prevalente em animais jovens. A diarreia por *C. parvum* é comum em vitelos jovens, mas praticamente nunca é vista em bovinos adultos. É possível que as alterações na microflora intestinal, maturação do epitélio intestinal ou outra alteração relacionada com a idade aumentem a resistência dos vitelos mais velhos e animais adultos à infecção por *C. parvum* (Harp, 2003). Em adição às alterações provocadas pela idade, a exposição ao parasita resulta numa resposta imune e subsequente resistência à reinfeção (Harp et al., 1990).

8.1 Resposta imunitária inata e adquirida

A imunidade inata é constituída por um conjunto de defesas que vão desde a presença contínua de substâncias inibidoras a respostas imediatas, ou a curto prazo, mediadas por células residentes (Wyatt, Riggs, Fayer, 2010). Em bezerros, a flora intestinal adquirida após o nascimento, têm sido apontada como importante competidor para a fixação de esporozoítos às células epiteliais intestinais (Harp, 2003). Uma classe de peptídeos antimicrobianos chamados defensinas e uma subclasse destes denominados β -defensinas podem ser elevados durante as infecções por *C. parvum* em vitelos. A imunidade inata, no entanto, não é suficiente para eliminar a infecção por *C. parvum* (Wyatt et al., 2010).

A imunidade adquirida, gerada por vacinação ou por recuperação de uma infecção, tem três características principais: 1) é de longa duração, 2) resulta no desenvolvimento de linfócitos de memória antigénio específicos, e 3) é específica para o agente patogénico que a estimulou. A imunidade adquirida pode incluir a resposta humoral e a resposta mediada por células. Após a exposição a *C. parvum*, os bezerros desenvolvem resposta imunitária humoral e mediada por células (Wyatt et al., 2010).

8.2 Resposta humoral

Em estudos realizados em vitelos, os animais que receberam colostro hiperimune, de vacas em fim de gestação imunizadas com a proteína p23 recombinante, excretaram menos oocistos e foram protegidos contra a doença clínica, sugerindo que os anticorpos neutralizantes podem fornecer protecção contra a criptosporidiose clínica (Perryman, Kapil, Jones e Hunt, 1999).

Os anticorpos libertados no lúmen intestinal podem ser excretados nas fezes. Estudos utilizando a proteína p23 recombinante identificaram, um dia após o nascimento, anticorpos anti- p23 nas fezes de animais clinicamente normais e negativos à excreção de oocistos. O colostro fornecido aos vitelos também continha anticorpos anti - p23, com títulos semelhantes aos encontrados nas amostras fecais correspondentes, o que sugere que os anticorpos fecais excretados a partir dos vitelos foram o resultado de transferência passiva de anticorpos (Wang et al., 2003 citado por Wyatt et al., 2010)

As várias classes e subclasses de anticorpos aparecem em diferentes momentos após a infecção. Os anticorpos IgG1 apareceram dentro de 5 dias após a infecção e os anticorpos IgG2 apareceram 7 dias após o início da infecção. Estes momentos estão associados com a doença clínica e a sua recuperação, respectivamente, e são consistentes com o desenvolvimento de anticorpos protetores libertados no lúmen do intestino durante a infecção por *C. parvum* (Wyatt et al., 2010).

8.3 Resposta celular

Duas subclasses de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) são importantes na resposta imunitária adquirida. A análise à população de linfócitos retirada do ileo de vitelos, previamente infectados com *C. parvum*, revelou a presença de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ em vários locais, incluindo as vilosidades, a lâmina própria e as placas de Peyer, em elevadas proporções quando comparados com o mesmo tecido de vitelos não infectados (Abrahamsen, 1998 citado por Wyatt et al., 2010).

Estes estudos mostram que a resposta imunitária na mucosa intestinal que inclui a produção de anticorpos e a resposta das células T está associada com a recuperação da doença clínica e a rapidez em reconhecer e eliminar o agente patogénico em caso de re-exposição à doença (Wyatt et al., 2010).

9. DIAGNÓSTICO

9.1 Diagnóstico clínico

Os sinais clínicos da Criptosporidiose não são patognomónicos, logo o seu diagnóstico baseia-se muitas vezes na história clínica do animal tendo em conta factores como, a idade, a presença de diarreias aquosas e profusas que não respondem ao tratamento e os factores de manejo e higiene da exploração. Uma vez que os sinais são inespecíficos e a diarreia ou enterite neonatal é um processo multifatorial que envolve para além dos aspectos ambientais e de manejo, outros agentes patogénicos como o vírus da diarreia viral bovina (BVD), o

coronavírus, o rotavírus ou *Escherichia coli.*, o diagnóstico definitivo da doença requer sempre a confirmação laboratorial.

9.2 Diagnóstico laboratorial

Não há nenhum teste ideal para o diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium*. A demonstração de oocistos ou antígenos de *Cryptosporidium* numa amostra devidamente recolhida e tratada é suficiente para um diagnóstico positivo (OIE, 2008).

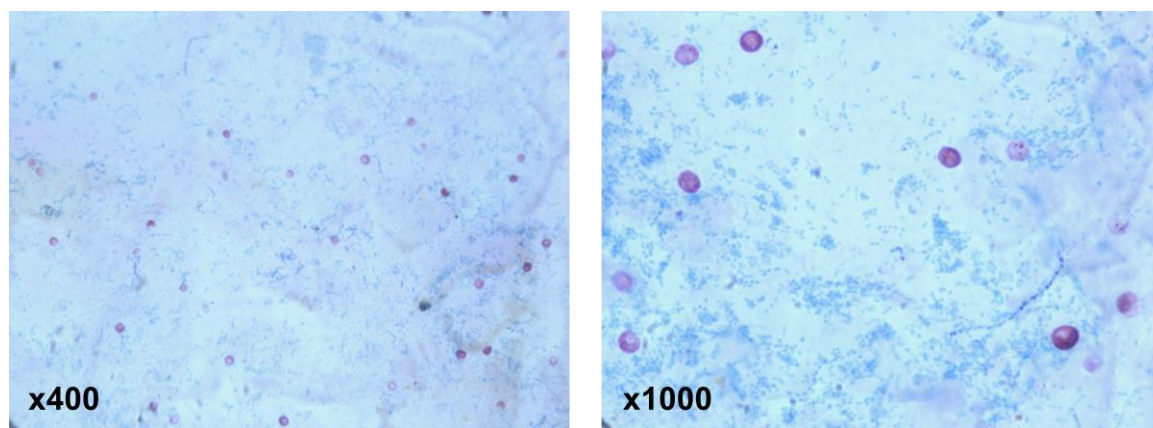
Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a detecção de infecções por *Cryptosporidium* nos animais. O exame histológico de seções de íleo, obtidas no exame *post-mortem* ou por biópsia, revelam organismos álcool-ácido resistentes nos vacúolos parasitóforos presentes na superfície luminal das células epiteliais do intestino (Trotz-Williams et al., 2007).

Para as espécies de *Cryptosporidium* que infectam o tracto gastrointestinal, o diagnóstico primário baseia-se na demonstração de oocistos nas fezes por colorações convencionais, ou colorações por fluorescência/imunofluorescência, ou na demonstração de copro-antígenos nas fezes por ELISA ou por métodos imunocromatográficos (OIE, 2008).

9.2.1 Exame microscópico

O método *standard* no diagnóstico do *Cryptosporidium* continua a ser a observação de oocistos nas fezes (O’Handley e Olson, 2006). O diagnóstico é geralmente estabelecido por métodos microscópicos convencionais e a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) modificada ou a coloração de fenol auramina, usando esfregaços fecais não concentrados, são usadas com frequência. Na coloração de ZN modificada os oocistos de *Cryptosporidium* sp. coram de vermelho em um fundo azul ou verde pálido. O grau de coloração e proporção variam com oocistos individuais. Além disso, as estruturas internas coram em graus variados, alguns podem parecer amorfos, enquanto outros podem conter formas em crescente, características dos esporozoítos. Os oocistos de *Cryptosporidium parvum* aparecem como discos com 4-6 µm de diâmetro. Na coloração de fenol auramina os oocistos aparecem em forma de anel ou ovóides e exibem uma cor verde caracteristicamente brilhante e fluorescente contra um fundo escuro (Casemore, 1991; OIE, 2008).

Figura 14: Oocistos de *Cryptosporidium* corados com Ziehl-Neelsen modificada (Fonte: original).



Os oocistos de *C. parvum*, *C. bovis* e *C. ryanae* são extremamente difíceis ou mesmo impossíveis de distinguir uns dos outros, os de *C. andersoni* são maiores e mais facilmente identificados.

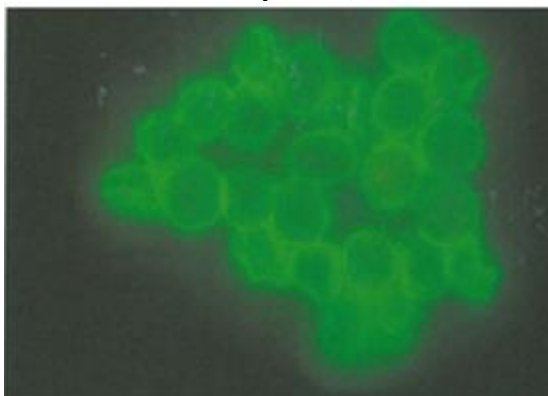
A concentração de oocistos nas fezes pode aumentar a sensibilidade de detecção. O açúcar, sal, sulfato de zinco ou solução de éter-formalina são as melhores opções para concentração de oocistos (OIE, 2008).

Apesar de rápidos e baratos estes métodos possuem baixa sensibilidade e/ou especificidade, em especial quando estão presentes baixos números de oocistos ou uma distribuição desigual nas fezes. De acordo com Fayer et al. (2000b) muitas das colorações requerem um operador com experiência, são trabalhosas e mesmo depois da concentração das fezes muitas infecções com baixa excreção de oocistos não são diagnosticadas.

9.2.2 Técnicas imunológicas

Os testes de imunofluorescência (IF), testes de ELISA e testes de imunocromatografia (IC) para detecção do *Cryptosporidium*, são hoje em dia muito utilizados em Medicina Veterinária. Tanto a IF como a ELISA são usadas de forma regular no diagnóstico clínico da criptosporidiose em vitelos, pois ambas utilizam anticorpos monoclonais que reconhecem epitopos na superfície dos oocistos. A elevada especificidade e sensibilidade quando comparadas com a microscopia de fundo claro são uma vantagem, tanto para a IF como para a ELISA. A especificidade é elevada (98 a 100%) (Smith, 2008). A maior desvantagem destes testes é a necessidade de equipamento adequado e pessoal qualificado.

Figura 15: Oocistos de *Cryptosporidium* sp. Microscopia de fluorescência. (In Gardiner, Fayer & Dubey, 1998).



Os ensaios imunocromatográficos fornecem aos laboratórios de diagnóstico um método alternativo conveniente para a realização de testes de detecção de antígenos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes, sendo a sua especificidade elevada (98-100%) (Smith, 2008). Estes testes não necessitam de material de laboratório e podem ser utilizados no campo pelo médico veterinário.

Uma das vantagens dos imunoensaios é o facto de permitirem a detecção da infecção mesmo nos casos em que ainda não ocorre a excreção de oocistos nas fezes (Smith, 2008). A maior limitação é a impossibilidade de se determinar a espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* envolvido.

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos indicam apenas a exposição passada ao *Cryptosporidium* e mais uma vez não permitem identificar espécies ou genótipos (Santin e Trout, 2008).

9.2.3 Técnicas moleculares

A identificação de parasitas ao nível da espécie e/ou genótipo possui grandes implicações em vários aspetos da parasitologia, incluindo o diagnóstico, a taxonomia, o tratamento e o controlo (Caccio, 2004).

As técnicas de biologia molecular não só permitem a detecção precisa e sensível de *Cryptosporidium*, mas também fornecem informações sobre a genética e variabilidade de isolados de *Cryptosporidium* (Fayer et al., 2000b).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica rápida, altamente específica e tem uma elevada sensibilidade, em teoria, o limite de detecção da PCR é um oocisto por amostra, e é adequado para a detecção e diagnóstico de *Cryptosporidium* (Fayer et al., 2000b). A PCR parece ser mais sensível do que a IF e fornece uma detecção altamente sensível de infecções que seriam perdidas por outros métodos (Santín et al., 2004).

A PCR é uma alternativa à microscopia e imunologia, especialmente no diagnóstico da criptosporidiose crónica ou assintomática e apesar das suas vantagens possui algumas limitações, entre elas, os falsos positivos e falsos negativos, a necessidade de equipamento e pessoal especializado e a ausência de informação sobre a viabilidade e infectividade do parasita. Os métodos indirectos como o RT-PCR (transcriptase reversa-PCR) permitem obter informação adicional neste aspecto. Além disso, com a recente introdução do PCR em tempo real, que permite a monitorização contínua ao longo da reacção, o aspecto quantitativo da infecção pode ser estudado com sensibilidade apurada. Isto irá, por exemplo, permitir detectar os estados de portador, determinar o número de oocistos presentes numa amostra e estudar os aspectos quantitativos da expressão do gene, durante as várias fases da infecção (Caccio, 2004).

A utilização de PCR como um método de rotina para o diagnóstico de criptosporidiose clínica em bovinos, provavelmente não é necessário, embora possa ser útil como uma ferramenta de diagnóstico em estudos epidemiológicos e na investigação.

10. TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLO DA CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA

A Criptosporidiose em bovinos de leite pode ser muito frustrante no que respeita ao seu controlo. Não aparenta ser uma grande ameaça à vida, como algumas estirpes de *Salmonella* por exemplo, mas sob o grupo certo de condições pode causar diarreia grave e morte em vitelos jovens (Nydam e Peregrine, 2005).

Um problema importante no controle do *C. parvum* é a falta de um meio eficaz para prevenir ou tratar a infecção. Assim, existe uma grande necessidade de se identificar um meio de controlar a infecção por *C. parvum* em bezerros, não só para reduzir o impacto económico sobre a produção, mas também para aliviar preocupações com o ambiente e com a saúde pública (Harp, 2003).

10.1 Tratamento

A presença quase constante de oocistos no meio ambiente, o ciclo de vida bem adaptado do parasita, e o impacto limitado de vacinas orais que foram avaliadas sob condições de campo reais (Harp e Goff, 1998), levam-nos muitas vezes ao tratamento dos vitelos doentes. Infelizmente, também aí a actividade do médico veterinário se torna frustrante.

Um grande número de fármacos já foram testados para o tratamento e profilaxia da criptosporidiose, mas nenhum demonstrou ser consistentemente eficaz (Harp e Goff, 1998; Nydam e Peregrine, 2005).

Entre os fármacos testados, a nitazoxanida (NTZ), a halofuginona, a paromomicina, o decoquinato, a lasalocid e a sulfaquinoxalina têm demonstrado atividade parcial contra a infecção por *C. parvum* em ruminantes (Wyatt et al., 2010).

A halofuginona, uma quinazolinona sintética é um dos fármacos que tem obtido melhores resultados em vitelos, incluindo diminuição do número de oocistos excretados e dos casos de diarreia. Vários estudos realizados em vitelos recém-nascidos infectados naturalmente e que envolveram grupos tratados e grupos controlo, demonstraram redução da excreção de oocistos e redução da gravidade da diarreia nos vitelos tratados com 100-120 µg/kg de peso vivo diariamente durante sete dias consecutivos (Lefay, Naciri, Poirier, Chermette, 2001; Trotz-Williams, Jarvie, Peregrine, Duffield, Leslie, 2011). Ainda no estudo realizado por Trotz-Williams et al. (2011) a média de crescimento dos vitelos foi consistentemente maior no grupo tratado do que no grupo de controlo e a mortalidade foi mais baixa no grupo tratado.

Também em Portugal um estudo realizado em vitelos mostrou que a administração de halofuginona *per os* com início nos primeiros dois dias de vida e durante uma semana, teve um efeito significativo na redução da excreção de oocistos e na diarreia aos 14 dias de idade. (Madeira de Carvalho et al., 2011).

O lactato de halofuginona está licenciado em Portugal e no resto da Europa para o tratamento da criptosporidiose bovina, mas é conhecido como sendo relativamente tóxico e cuidados devem ser tomados para não exceder a dose recomendada. Este fármaco é capaz de prevenir os sinais clínicos da doença e reduzir a excreção de oocistos, no entanto os vitelos iniciam a excreção de oocistos pouco depois da retirada do fármaco (Shahiduzzaman e Dauschies, 2012). O tratamento deve ser dado oralmente numa dose diária de 100 µg/kg durante sete dias e deve ser iniciado logo após o nascimento. Uma dose diária de 100 µg/kg de halofuginona administrada durante uma semana reduz significativamente a excreção de oocistos, embora não previna futuras excreções (Lallemond, Villeneuve, Belda, Dubreuil, 2006).

A nitazoxanida (NTZ), uma benzamida nitrotiazol com um amplo espectro antibacteriano e antiprotozoário, tem mostrado alguma eficácia em testes em humanos imunocomprometidos e imunocompetentes, reduzindo a excreção de oocistos e a gravidade da diarreia (Wyatt et al., 2010). De acordo com o estudo realizado por Ollivett et al. (2009) o tratamento de vitelos com NTZ reduziu a duração da excreção de oocistos e melhorou a consistência fecal, porém, a NTZ não está licenciada para o uso em animais de produção.

Vários estudos realizados com o decoquinato, um coccidiostático, tentaram atestar a sua utilização como profilático e como tratamento da criptosporidiose bovina. No entanto, de acordo com estudos feitos por Moore et al. (2003) e Lallemond et al. (2006) o decoquinato não mostrou qualquer efeito na excreção de oocistos ou nos sinais clínicos apresentados pelos vitelos.

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, que embora não esteja registado para o tratamento da criptosporidiose, a profilaxia com sulfato de paromomicina é eficaz na prevenção da excreção de oocistos, dos sinais clínicos e da mortalidade em bezerros e cabritos, numa dose de 100 mg/kg de peso vivo por dia durante 10 ou 11 dias consecutivos (Fayer e Ellis, 1993).

A azitromicina, é um antibiótico macrólido com eficácia terapêutica contra o *Cryptosporidium*, também diminui a excreção de oocistos e reduz a gravidade dos sinais clínicos em bezerros naturalmente infectados, no entanto é muito caro para uso em produções leiteiras comerciais (Elitok, Elitok, Pulat, 2005). Este antibiótico já mostrou uma eficácia de 88,2% em vitelos 21 dias após o tratamento (Nasir et al., 2013).

O lasalocida mostrou alguma eficácia em doses relativamente altas de 5-15 mg/kg de peso corporal. Infelizmente, as doses de 5-8 mg/kg de peso corporal têm-se mostrado letais para vitelos recém-nascidos (Nydam e Peregrine, 2005).

A trimetoprim-sulfamida, a sulfadimetoxina e o amprolium também provaram ser ineficazes contra a infecção por *Cryptosporidium* (Nydam e Peregrine, 2005). O co-trimoxazole e o kalvangi (pó de extrato de *Nigella sativa*) também se mostraram ineficazes contra este parasita em vitelos (Nasir et al., 2013).

Desta forma, o tratamento da criptosporidiose nos vitelos fica limitado muitas vezes a uma terapia de suporte com eletrólitos, de modo a manter o balanço de fluídos. Felizmente, a maioria dos vitelos clinicamente doentes respondem à fluidoterapia e aos cuidados de suporte. A intervenção deve ser persistente e precoce com soluções de eletrólitos orais, enquanto a alimentação com leite ou substituto do leite continua a uma taxa diária normal, se necessário e possível, as tomas de leite devem ser divididas em tomas mais frequentes e menores. É necessário especial atenção para a acidose metabólica associada à diarreia induzida pelo *Cryptosporidium* e considerar a suplementação dos fluidos intravenosos com bicarbonato de sódio (Nydam e Peregrine, 2005).

10.2 Vacinação

A vacinação tem sido proposta como um método para controlar a criptosporidiose nas populações animais. Usando abordagens de imunização activa e passiva as vacinas têm

mostrado reduzir os sinais clínicos da doença mas, na maioria dos casos, a excreção de oocistos não foi eliminada ou reduzida (Olson et al., 2004).

Um estudo realizado por Perryman et al. (1999) demonstrou que a imunização de vacas antes do parto com uma proteína recombinante induzia a produção de colostro hiperimune que uma vez fornecido aos bezerros os protegia contra a doença e reduzia significativamente a excreção de oocistos.

No entanto, hoje em dia, não existem vacinas aprovadas para a prevenção da criptosporidiose, e embora os anticorpos possam ser encontrados no colostro bovino, os níveis em que estão presentes não são protectores para os vitelos que recebem este colostro (Wyatt et al., 2010). A razão desta inabilidade dos anticorpos em proteger os vitelos poderá ser o facto do *Cryptosporidium* ser um parasita intracelular e extracitoplasmático, que conduz tanto à ineficácia de vacinas, como de tratamentos.

10.3 Medidas de controlo

Uma vez que as infecções começam com a ingestão de oocistos, as estratégias de controlo desta doença devem visar não só a terapia, mas também a redução do número de oocistos no ambiente. É de se esperar que um tratamento bem-sucedido reduza os sinais clínicos e a excreção de oocistos. Contudo a erradicação do *Cryptosporidium* do ambiente em que os animais vivem é na maioria dos casos uma tentativa irrealista. No entanto, estratégias de controlo eficazes incluem não só o tratamento dos indivíduos afectados ou expostos mas também medidas de higiene adequadas e boas práticas de manejo (Shahiduzzaman e Dauschies, 2012).

As medidas de higiene são essenciais para reduzir a carga de contaminação ambiental e desta forma prevenir a propagação da infecção a vitelos susceptíveis. A limpeza intensiva das superfícies contaminadas, a remoção rápida dos dejetos e o destino adequado dos detritos contaminados elimina os oocistos, assim como reduz o risco de infecção (Shahiduzzaman e Dauschies, 2012). Através do correcto manejo higiénico, a concentração de oocistos no lodo e nas águas de escorrência dos alojamentos é marcadamente reduzida, reduzindo assim o risco de contaminação das águas de superfície com oocistos de *Cryptosporidium*, o que é particularmente importante na prevenção da infecção zoonótica (Fayer et al., 2004).

A remoção frequente das camas e a limpeza rigorosa combinada com a desinfecção também ajudam a reduzir a carga de oocistos no ambiente. Embora muitas vezes difícil num ambiente de produção intensiva, este passo é de extrema importância antes da introdução de novos vitelos na exploração.

Infelizmente um dos motivos pelo qual *C. parvum* é difícil de controlar é a sua extrema resistência aos desinfetantes. Os desinfetantes comerciais são ineficazes quando usados nas concentrações recomendadas e as concentrações e o tempo de exposição necessários para a destruição do *C. parvum* podem representar um risco aceitável para humanos e animais. Contudo os oocistos são susceptíveis a temperaturas extremas e à dessecação. A lavagem com água quente seguida duma secagem bem efectuada pode ser um meio eficaz de destruição de *Cryptosporidium* (Harp e Goff, 1998). A lavagem e a desinfecção de utensílios como baldes, tetinas e biberões e vestuário também são aconselhadas e de extrema importância.

As boas práticas de manejo incluem também alojamentos individuais, quentes e secos, de preferência no exterior (Castro-Hermida et al., 2002a; Quigley et al., 1994). As densidades elevadas devem ser evitadas (Atwill et al., 1999b). Uma unidade de quarentena deve estar presente na exploração de forma a isolar os vitelos clinicamente afectados, pois o alojamento de vitelos doentes próximo a vitelos saudáveis é um meio garantido de propagação da doença. Os vitelos doentes devem ser sempre tratados por último e os utensílios, botas e vestuário devem ser exclusivos para uso nestes vitelos. É também importante assegurar uma adequada ingestão de colostro (Mohammed et al., 1999), este deve ser administrado até um máximo de 6 horas após o nascimento. O colostro é considerado de boa qualidade se possuir 50g IgG/l ou mais (Lorenz, 2009).

Tabela 6: Características de *Cryptosporidium*, risco epidemiológico e principais medidas preventivas.

Características	Risco epidemiológico	Medidas preventivas
Elevada excreção de oocistos nas fezes	Risco de infecção pode aumentar num curto espaço de tempo Animais adultos podem actuar como portadores	Evitar densidades elevadas Separação de vitelos doentes Higiene e desinfecção apropriada das instalações e equipamentos Sistema <i>all in/all out</i> Separação dos jovens dos adultos
Oocistos extremamente resistentes no ambiente	Oocistos podem sobreviver no ambiente por vários meses	Higiene e desinfecção apropriada das instalações e equipamentos Sistema <i>all in/all out</i>
Oocistos extremamente resistentes aos desinfetantes comuns	Desinfecção com desinfetantes comuns não é eficaz	Produtos à base de amónia, dióxido de cloro, dióxido de hidrogénio ou azoto
Oocistos apenas sensíveis ao calor e desidratação	Infecção é mais comum nos ambientes húmidos das instalações	Evitar densidades elevadas Higiene apropriada Lavagem com utilização de vapor

11. IMPACTO ECONÓMICO

O impacto económico das infecções por *C. parvum* nos ruminantes está limitado aos gastos directos envolvendo o tratamento de animais clinicamente doentes e aos gastos indirectos relacionados com as perdas por mortalidade e mau desempenho a longo prazo dos vitelos infectados. Os problemas de diarreia em vitelos necessitam cuidados especiais: administração de soluções de electrólitos, administração de fármacos, medidas de higiene, entre outras que são dispendiosas e trabalhosas (De Graff et al., 1999). Os custos podem ser bastante substanciais e prolongados em caso de surtos (Madeira de Carvalho et al., 2011).

A criptosporidiose abomasal pode ser uma doença limitante à produção. A diminuição da eficiência alimentar já foi reportada em *feedlots* e vacas de leite que excretam oocistos de *C. andersoni* produzem significativamente menos leite (Ralston et al., 2003 e Esteban et al., 1995 citados por O’Handley e Olson, 2006).

CAPÍTULO III: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA CRIPTOSPORIDIOSE EM VITELOS DE EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA TERCEIRA, AÇORES

1. OBJECTIVOS

A ilha Terceira possui um efectivo de bovinos leiteiros com cerca de 50400 animais distribuídos por 728 explorações leiteiras (PISA Açores, 2014). Sendo a pecuária a actividade económica mais importante, torna-se essencial a melhoria da produtividade e da saúde animal aliados ao bem-estar animal e à redução de custos.

A escolha do tema prendeu-se com o facto de a Criptosporidiose ser ainda uma parasitose pouco conhecida pelos produtores e que afecta essencialmente os animais jovens. Animais estes que são ainda muitas vezes sujeitos a más práticas de manejo, em especial nas explorações familiares e pouco modernizadas. O conhecimento da prevalência desta parasitose e de possíveis práticas que favoreçam a sua transmissão é fundamental para o delineamento de medidas de prevenção e controlo da doença nos animais e de protecção da saúde pública.

No âmbito do tema os principais objectivos deste estudo foram:

- i) A investigação da presença de *Cryptosporidium* sp. em vitelos com e sem sinais clínicos da doença provenientes de explorações leiteiras da ilha Terceira;
- ii) A identificação dos principais factores de risco e práticas de manejo realizadas nas explorações, associados à infecção por *Cryptosporidium* nesta ilha.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização geo-climática da ilha Terceira

A ilha Terceira é a terceira maior ilha do arquipélago dos Açores com uma área aproximada de 400,27 Km², está localizada no grupo central a 38° 42` de latitude Norte e 27° 12` de longitude Oeste. Possui uma morfologia acidentada característica da sua natureza vulcânica, a metade ocidental da ilha é a mais montanhosa e é onde se situa o ponto mais alto, a Serra de Santa Bárbara com 1021 m de altitude, a metade oriental é mais plana dominada por uma grande extensão de pastagens com altitude média na ordem dos 390 m. De acordo com os dados do Serviço Regional de Estatística dos Açores (SREA) a ilha Terceira possuía em 2009 cerca de 19739 ha de superfície de prados e pastagens permanentes destinados à pecuária. O clima da ilha é temperado marítimo, ou seja, é um clima temperado húmido com verão

temperado e baixas amplitudes térmicas, segundo dados de 2012 a temperatura média anual é de 17,5°C e a precipitação total anual é de 1137,5 mm (SREA, 2014).

2.2 Regime de exploração leiteira

O sistema de produção é em regime semi-extensivo com utilização de pastagem para o pastoreio directo. Devido à orografia do terreno e à disponibilidade de terrenos para pastagens as explorações distribuem-se em parcelas muitas vezes sem contiguidade e localizadas em diferentes cotas de altitude, pastagens baixas e nas zonas costeiras são utilizadas no Inverno e pastagens altas e médias utilizadas no Verão. As melhores pastagens são dedicadas geralmente aos animais em produção sendo as vacas secas, machos e novilhas, mantidos em grupos separados que utilizam as pastagens de menor valor nutricional. A ordenha na maioria das explorações é móvel e acompanha as deslocações das manadas o que implica mais mão-de-obra e dificulta a ordenha em boas condições higiénicas. Nas explorações maiores e mais modernas a ordenha é fixa e as vacas em lactação são estabuladas temporariamente e suplementadas com concentrado e forragem em sistemas “unifed”.

Em relação ao maneio dos vitelos, por norma os vitelos são separados da mãe entre o primeiro e o oitavo dia de nascimento e alimentados à mão, sendo mantidos junto à casa dos proprietários no pasto ou em instalações rudimentares. Todos tomam colostro que poderá ser fornecido até aos oito primeiros dias. Os vitelos seleccionados para ficarem na exploração são amamentados com leite de vaca até aos 2-3 meses de idade, altura em que é feito o desmame.

2.3 População alvo

A amostragem neste estudo foi condicionada de acordo com a acessibilidade às explorações, disponibilidade dos proprietários em participar no estudo, presença de animais com as idades pretendidas e ainda disponibilidade de recursos laboratoriais e tempo para a colheita da amostras. Desta forma a amostragem utilizada foi de conveniência não probabilística. A amostra compreendeu um total de 250 vitelos com idades compreendidas entre 1 e 60 dias de idade e estratificados em 5 grupos etários: grupo 1 (1 a 7 dias), grupo 2 (8 a 15 dias), grupo 3 (16 a 21 dias), grupo 4 (22 a 29 dias) e grupo 5 (≥ 30 dias). Os animais eram provenientes de 51 explorações leiteiras que se encontram distribuídas por diferentes zonas da ilha (ver Anexo 2). Todos os vitelos foram nascidos nas respectivas explorações de estudo.

2.4 Colheita de amostras

Cada exploração foi visitada uma única vez entre Novembro de 2012 e Abril de 2013 aproveitando a época de maior frequência de partos. A colheita de fezes foi efectuada a todos

os vitelos presentes na exploração no dia da visita e que possuíam a idade pretendida. Uma única amostra de aproximadamente 20 g de fezes foi colhida a cada vitelo, por estimulação rectal directamente para um recipiente plástico individual, limpo e previamente identificado. Da identificação constavam a data da colheita, a identificação e a idade do animal. Ainda na altura da colheita foi registada a consistência de cada amostra de fezes colhida, utilizando a escala de scores fecais de 1 a 4 proposta por Larson et al. (1977) e descrita na tabela 7. Os scores 3 e 4 foram registados como sendo indicadores de diarreia enquanto os scores 1 e 2 indicam consistências fecais normais.

Tabela 7: Consistência das fezes (adaptado de Larson et al., 1977).

Score fecal	Consistência
Score 1	Fezes normais, firmes mas não duras
Score 2	Fezes pastosas, espalham-se ligeiramente
Score 3	Fezes semi-pastosas, espalham-se rapidamente
Score 4	Fezes de consistência líquida

Após a colheita as amostras eram acondicionadas em caixas de transporte isotérmicas e transportadas no próprio dia para o laboratório. Já no laboratório as amostras foram refrigeradas a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ até ao momento do processamento. A análise das amostras foi realizada no Laboratório Regional de Veterinária dos Açores.

Figura 16: Colheita e acondicionamento das amostras em frascos (Fonte: original).



2.5 Questionário

Um pequeno questionário (Anexo 1) foi desenvolvido de forma a obter dados sobre os animais e as práticas de manejo utilizadas na exploração. O questionário foi realizado a todos os produtores no dia de cada visita às respectivas explorações.

As questões foram obtidas de forma a reunir informação sobre as práticas de manejo descritas na literatura como associadas ao risco de excreção de oocistos de *C. parvum*, assim como, outros factores considerados importantes. Alguns destes factores foram o tempo de permanência dos vitelos com a mãe após o nascimento, o fornecimento de colostro, o tipo de alojamento e as práticas de higiene.

2.6 Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* foi utilizada a técnica de esfregaço fecal corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Casemore, 1991; Madeira de Carvalho et al., 2011).

A) Preparação de esfregaços fecais

- Colocar uma gota de água destilada numa lâmina de vidro;
- Adicionar uma pequena quantidade de fezes e homogeneizar bem com ajuda de uma zaragatoa;
- Deixar secar ao ar durante a noite.

B) Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

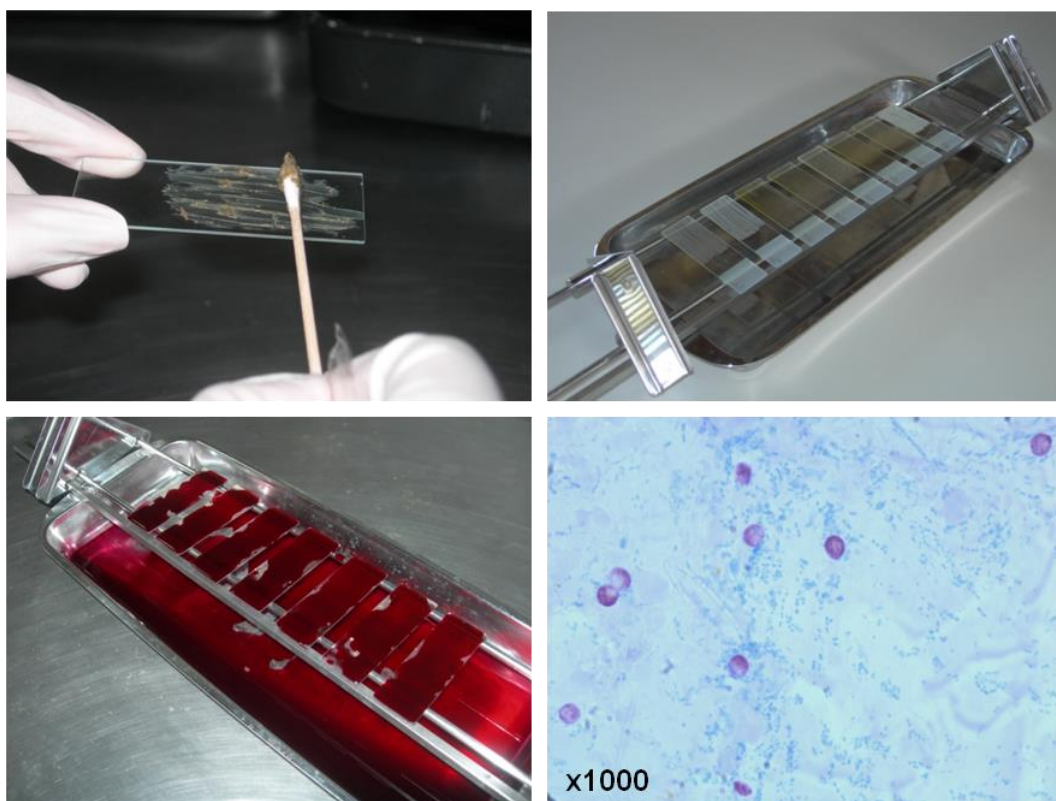
- Fixar o esfregaço fecal bem seco com metanol durante 1 minuto;
- Cobrir a lâmina com fucsina básica fenicada durante 10 minutos;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir a lâmina com álcool clorídrico a 1% de forma a eliminar o corante em excesso;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir a lâmina com azul-de-metileno durante 30 segundos;
- Lavar bem com água corrente;
- Deixar secar bem ao ar e em papel absorvente.

C) Observação microscópica

A observação microscópica das lâminas foi realizada em microscópio óptico de fundo claro utilizando ocular de 10x e objectivas de 10x, 40x e 100x (lente de imersão). Consideraram-se como positivas todas as lâminas com pelo menos um oocisto de *Cryptosporidium*. Os oocistos

foram identificados com base nas suas propriedades ópticas e morfológicas como estruturas esféricas ou subesféricas com tamanho aproximado de 4-6 μm , de cor rosa brilhante a rosa pálido com granulações ou esporozoítos em forma de crescente. Todo o esfregaço fecal foi examinado e a intensidade da infecção foi estimada quantitativamente de acordo com o número de oocistos encontrados numa ampliação de 1000x: nível I (1 oocisto), nível II (2-5 oocistos), nível III (6-10 oocistos) e nível IV (>10 oocistos) (Castro-Hermida et al., 2002b; Madeira de Carvalho et al., 2011).

Figura 17: Esfregaço fecal e coloração de Ziehl-Neelsen modificada (Fonte: original).



2.7 Análise estatística

Todos os dados recolhidos, através do questionário e da observação directa, foram introduzidos numa base de dados em ficheiro Excel 2007. A análise dos dados foi realizada utilizando as ferramentas do Microsoft Office Excel 2007 para a análise descritiva e o programa estatístico R versão 3.1.0_2014 para a análise analítica.

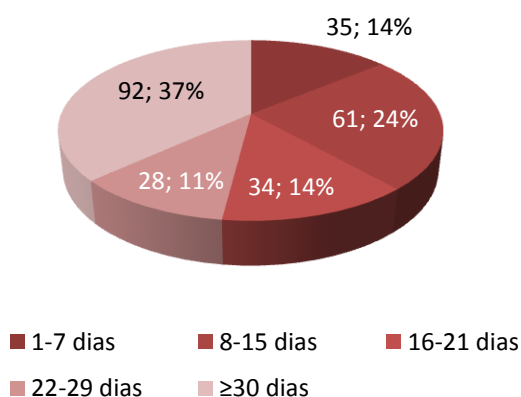
De acordo com Brook et al. (2008) a prevalência de explorações foi calculada como o número de explorações com pelo menos um animal positivo, dividido pelo número total de explorações do estudo e a prevalência global foi calculada como o número de animais positivos a *Cryptosporidium*, dividido pelo número total de animais amostrados.

Para verificar as possíveis associações entre as diferentes variáveis estudadas foi realizado o teste Qui-quadrado. O teste-T independente foi utilizado para comparar as altitudes e comparar os declives do terreno onde se situam as explorações. Os testes estatísticos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Foram testados um total de 250 vitelos pertencentes a 51 explorações, o animal mais novo tinha um dia de idade e o animal mais velho 60 dias de idade. Depois de divididos pelos respectivos grupos etários verifica-se que o grupo etário mais representado no estudo foi o que compreende a idade superior ou igual a 30 dias representando 37% dos animais, seguido do grupo entre os 8 e os 15 dias com 24% dos animais. Os grupos dos 1 aos 7 dias, dos 16 aos 21 dias e dos 22 aos 29 dias foram os menos representados com 14%, 14% e 11% dos animais respectivamente (Gráfico 5).

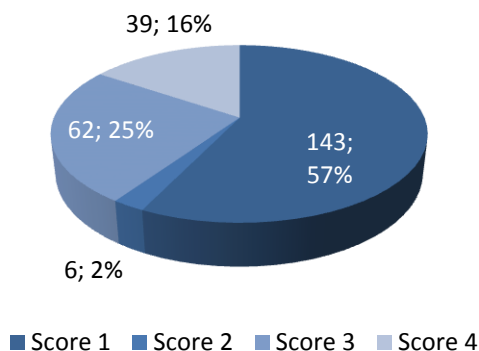
Gráfico 5: Distribuição das amostras por grupos etários (N observado e % em relação ao total).



A análise das características macroscópicas das fezes revelaram que 57% (143/250) das amostras apresentou score 1, 25% (62/250) das amostras apresentou score 3, 16% (39/250) apresentou score 4 e o score 2 surgiu em 2% (6/250) das amostras (Gráfico 6).

Agrupando em apenas dois grupos de acordo com a consistência, as fezes diarreicas representam 41% (101/250) das amostras e as fezes consideradas normais representam as restantes 59% (149/250).

Gráfico 6: Distribuição das amostras por scores fecais (N observado e % em relação ao total).



3.1 Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp.

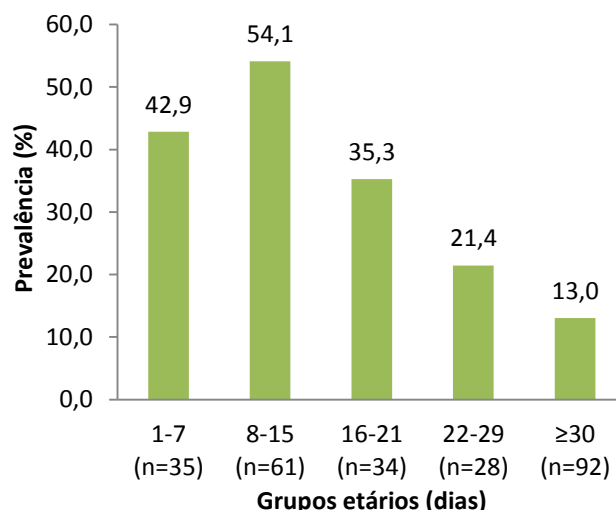
Dos 250 vitelos analisados neste estudo 31,2% (n=78) foram positivos à pesquisa de *Cryptosporidium* sp. de acordo com a técnica do esfregaço fecal corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

Das 51 explorações incluídas no estudo, 28 possuíam um ou mais vitelos positivos à presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp., representando uma prevalência de 54,9%.

3.1.1 Prevalências de acordo com o grupo etário

De acordo com o representado no gráfico 7, a maioria dos animais positivos pertencia ao grupo 2 (entre os 8 e os 15 dias) representando 54,1% (33/61), o segundo grupo com maior prevalência foi o grupo 1 (entre 1 e 7 dias) com 42,9% (15/35), o grupo 3 (dos 16 aos 21 dias) obteve uma prevalência de 35,3% (12/34), o grupo 4 (dos 22 aos 29 dias) obteve uma prevalência com 21,4% (6/28) e finalmente o grupo 5 (animais com idade igual ou superior a 30 dias) com uma prevalência de 13,0% (12/92). A distribuição das amostras positivas a *Cryptosporidium* sp. foi significativamente diferente entre os diferentes grupos etários ($p < 0,05$).

Gráfico 7: Prevalência de *Cryptosporidium* sp. segundo o grupo etário.



3.1.2 Prevalências de acordo com a consistência das fezes

A distribuição das amostras positivas ao *Cryptosporidium* sp. foi significativamente diferente entre os diferentes scores fecais ($p < 0,05$). De acordo com a tabela 8 a maior percentagem de positivos ocorreu nos animais que apresentaram score fecal 4, das 39 amostras, 36 (92,3%) foram positivas a *Cryptosporidium* sp., nos animais com score fecal 2 das 6 amostras, 2 (33,3%) foram positivas, com score fecal 3 das 62 amostras, 18 (29,0%) também foram positivas e nos animais com score fecal 1, 22 (15,4%) amostras de 143 foram positivas a *Cryptosporidium* sp.

Tabela 8: Amostras positivas de acordo com o score fecal.

	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Total
Amostras positivas a <i>Cryptosporidium</i> sp.	22 15,4%	2 33,3%	18 29,0%	36 92,3%	78 31,2%
Amostras negativas a <i>Cryptosporidium</i> sp.	121 84,6%	4 66,7%	44 71,0%	3 7,7%	172 68,8%
Total	143	6	62	39	250

Agrupando as amostras em apenas dois grupos considerando a sua consistência, nas fezes diarreicas 54 das 101 (53,5%) amostras foram positivas a *Cryptosporidium* sp., enquanto nas fezes normais em 24 das 149 (16,1%) amostras foi detectado *Cryptosporidium* sp. (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras positivas de acordo com a consistência das fezes.

	Fezes normais	Fezes diarreicas	Total
Amostras positivas a <i>Cryptosporidium</i> sp.	24 16,1%	54 53,5%	78 31,2%
Amostras negativas a <i>Cryptosporidium</i> sp.	125 83,9%	47 46,5%	172 68,8%
Total	149	101	250

3.1.3 Intensidade de infecção

A relação entre as características macroscópicas das fezes e a intensidade de infecção por *Cryptosporidium* sp. descritas na tabela 10 revelou que 46,3% (25/54) das fezes diarreicas mostraram um nível de infecção IV com mais de 10 oocistos /lâmina observados a 1000x. O nível de infecção II (2-5 oocistos/lâmina) surgiu em 25,9% (14/54) das fezes diarreicas seguindo-se o nível de infecção III (6-10 oocistos/lâmina) em 22,2% (12/54) das fezes diarreicas e o nível de infecção I (1 oocisto/lâmina) em apenas 5,6% (3/54).

Nas fezes normais a pesquisa revelou que 62,5% (15/24) das amostras apresentavam nível de infecção II, o nível de infecção III surgiu em 25% (6/24) das fezes normais e o nível de infecção I em 12,5% (3/24), não havendo nenhuma amostra de fezes normais com o nível de infecção mais elevado (nível IV).

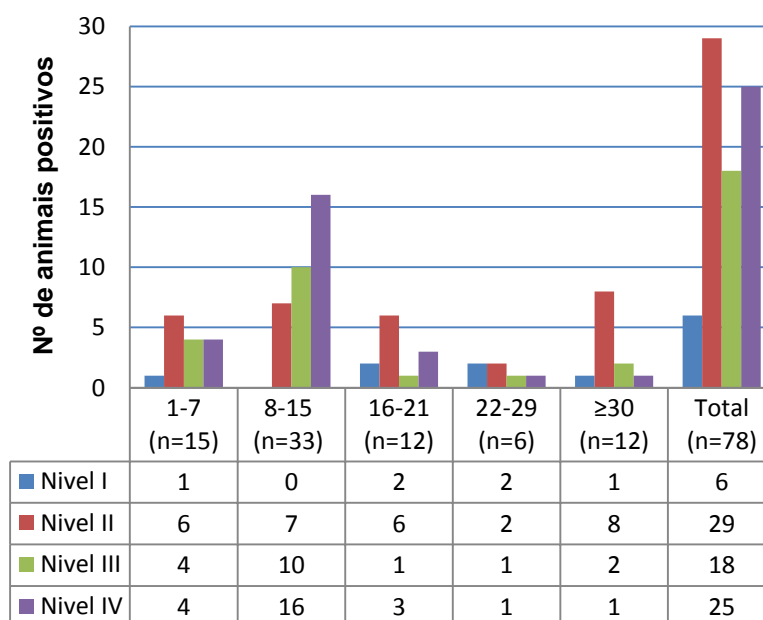
Tabela 10: Nível de infecção de acordo com a consistência das fezes.

	Fezes Normais	Fezes Diarreicas	Total
Nível I (1 oocisto/lâmina)	3 12,5%	3 5,6%	6 7,7%
Nível II (2-5 oocistos/lâmina)	15 62,5%	14 25,9%	29 37,2%
Nível III (6-10 oocistos/lâmina)	6 25%	12 22,2%	18 23,1%
Nível IV (>10 oocistos/lâmina)	0 0	25 46,3%	25 32%
Total	24	54	78

Relacionando a intensidade de infecção com a idade dos animais (gráfico 8) verificou-se que o grupo etário entre os 8 e os 15 dias foi o grupo que obteve maior número de animais com níveis de infecção elevados. No grupo etário entre os 8 e 15 dias de idades, 16 (48,5%) dos 33 animais apresentaram um nível de infecção IV, 10 (30,3%) dos 33 animais apresentaram nível de infecção III e o nível de infecção II surgiu em 7 (21,2%) dos 33 animais. Neste grupo etário nenhum animal apresentou o nível de infecção mais baixo (nível I).

O nível de infecção II foi o mais representado sendo que 29 (37,2%) dos 78 animais positivos apresentaram nível de infecção II. O nível de infecção IV surgiu em 25 (32%) dos 78 animais positivos sendo o maior número (n=16) pertencente ao grupo etário entre os 8 e 15 dias de idade, 4 animais pertenciam ao grupo dos 1-7 dias, 3 animais eram do grupo etário dos 16-21 dias e os restantes 2 animais pertencentes aos grupos etários com mais de 22 dias de idade. O nível de infecção III surgiu em 18 (23,1%) das 78 amostras positivas sendo que destas, 10 animais pertenciam ao grupo etário dos 8-15 dias de idade, 4 amostras pertenciam ao grupo dos 1-7 dias e as restantes aos grupos com mais de 16 dias de idade. Apenas 6 (7,7%) dos 78 animais positivos apresentaram nível de infecção I encontrando-se distribuídos pelos grupos etários dos 1 a 7 dias e com idade superior a 16 dias.

Gráfico 8: Relação entre o nível de infecção e os grupos etários.



3.2 Inquérito realizado nas explorações

Não se obteve nenhuma associação estatística significativa ($p>0,05$) entre as diferentes variáveis obtidas através do questionário às explorações, desta forma será apenas relatada a caracterização das explorações.

3.2.1 Local de nascimento dos vitelos

Das explorações incluídas no estudo, nenhuma possuía maternidades. Em todas as explorações ($n=51$) os vitelos nasciam na pastagem, ainda assim 14% das explorações (7/51) possuíam pastagens destinadas à parição, enquanto nas restantes 86% (44/51) os partos ocorriam em pastagens comuns a todos os animais.

3.2.2 Separação dos vitelos após o nascimento

Das 51 explorações, 94% (48/51) separavam os vitelos da mãe logo após o nascimento, ou na manhã seguinte caso o parto ocorresse durante a noite. Em apenas 3 explorações (6%) os proprietários responderam que mantinham os vitelos com a mãe por tempo indeterminado.

3.2.3 Administração de colostro

O colostro era fornecido aos vitelos recém-nascidos nas primeiras 6-12 horas após o nascimento em 82% (42/51) das explorações. Nas restantes 14% (9/51) o colostro era fornecido num período superior a 12 horas após o nascimento.

3.2.4 Alojamento ou contenção dos vitelos

Quanto ao tipo de alojamento dos vitelos 69% (35/51) das explorações do estudo mantinham os vitelos no exterior (considerando-se o exterior a própria pastagem), as restantes 31% (16/51) possuíam instalações fechadas para os vitelos.

Nos gráficos 9 e 10 estão descritas as diferentes variantes de alojamento ou contenção dos vitelos encontrados nas explorações. Das explorações que mantinham os vitelos na pastagem, 66% (23/35) mantinham os vitelos em grupo e 34% (12/35) mantinham os vitelos separados e contidos por corda. Das explorações com vitelos no interior, 81% (13/16) mantinham os vitelos em boxes individuais e apenas 19% (3/16) das explorações mantinham os vitelos no interior mas em parque colectivo.

Gráfico 9: Tipo de alojamento/contenção no exterior.

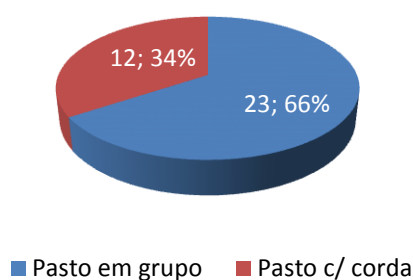
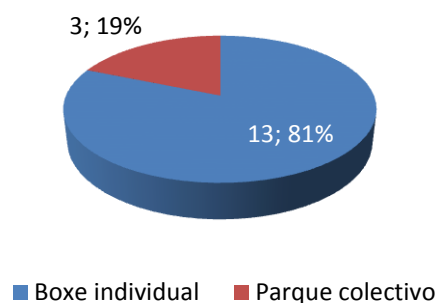


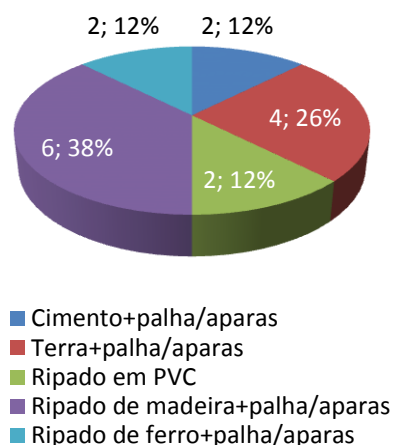
Gráfico 10: Tipo de alojamento/contenção no interior.



3.2.5 Tipo de piso e higiene dos alojamentos interiores

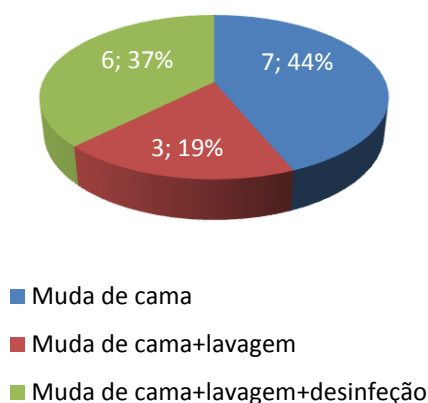
Os tipos de piso e higiene dos alojamentos interiores estão descritos no gráfico 11 e no gráfico 12. Nas 16 explorações que possuíam vitelos alojados no interior o piso em ripado de madeira com cama de palha/aparas de madeira foi o mais representado com 38% (6/16) das explorações a utilizar este piso. O piso de terra com cama de palha/aparas de madeira foi encontrado em 26% (4/16) das explorações, seguido dos pisos de ripado em ferro com cama de palha/aparas de madeira, cimento com cama de palha/aparas de madeira e ripado em PVC cada um com 12% (2/16) das explorações.

Gráfico 11: Tipos de piso dos alojamentos.



No que diz respeito a medidas de higiene nos alojamentos, apenas 6 explorações (37%) realizavam muda da cama com lavagem e desinfecção das instalações, 3 explorações (19%) realizavam muda da cama com lavagem do piso e 7 explorações (44%) apenas realizava a muda da cama (gráfico 12).

Gráfico 12: Medidas de higiene nos alojamentos.

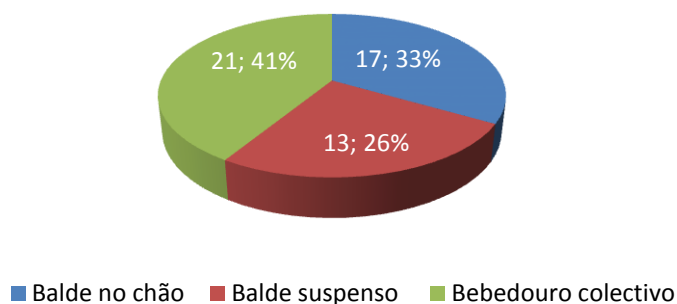


3.2.6 Origem da água e tipo de abeberamento dos vitelos

Quanto ao tipo de abeberamento dos vitelos descrito no gráfico 13, 33% (17/51) das explorações utilizavam balde individual no chão, 26% (13/51) das explorações utilizavam balde individual suspenso e os bebedouros colectivos eram utilizados em 41% (21/51) das explorações.

Em 57% (29/51) das explorações a água era proveniente da rede pública, nas restantes 43% (22/51) a água era recolhida de tanques e/ou lagoas.

Gráfico 13: Tipo de abeberamento dos vitelos.



3.2.7 História de diarreia neonatal e vacinação

Em relação ao historial de diarreias neonatais nas explorações apenas 19 (37%) das 51 explorações afirmaram possuir diarreias em recém-nascidos todos os anos, as restantes 32 (63%) explorações afirmaram possuir diarreias em vitelos muito raramente. Apenas 11 (22%) explorações praticavam vacinações, as restantes 40 (78%) não realizavam qualquer tipo de vacinação.

3.2.8 Localização das explorações

De acordo com o Anexo 2 a maioria das explorações estudadas localiza-se a uma cota de altitude mais baixa o que poderia ser um factor importante se tivermos em conta a direcção da escorrência das águas. No entanto não foi possível demonstrar associação significativa entre as explorações e a altitude e o declive do terreno ($p>0,05$).

4. DISCUSSÃO

O objectivo principal deste estudo pretendia avaliar a prevalência da infecção por *Cryptosporidium* sp., em vitelos com idade até aos 60 dias de diversas explorações leiteiras da ilha Terceira. Desta forma, o objectivo deste estudo foi plenamente atingido, ficando demonstrado que 31,2% dos vitelos estudados se encontravam infectados por *Cryptosporidium* sp. e 54,9% das explorações estudadas possuíam um ou mais vitelos infectados.

Os valores obtidos neste estudo encontram-se entre os valores obtidos em outros estudos realizados em Portugal. Nos Açores, ilha de S. Miguel, Martins (2013) reportou a presença de *Cryptosporidium* sp. em 26% das amostras de fezes analisadas (valores inferiores aos do presente trabalho). Também nos Açores, Pereira da Fonseca e Cannas da Silva reportaram uma proporção de *Cryptosporidium parvum* de 100% utilizando no entanto um teste imunoenzimático. Outros estudos realizados em vitelos reportaram prevalências de 25,4% na zona Noroeste de Portugal Continental (Mendonça et al., 2007) e 74,8% também no noroeste de Portugal Continental em animais até 12 semanas (Martins et al., 2007). Noutro estudo realizado por Pereira da Fonseca (2000) na zona de Montemor-o-Novo foi obtida uma prevalência de 23,3%.

A Criptosporidiose é uma parasitose que se encontra distribuída mundialmente. Uma prevalência de 31,2% é relativamente semelhante às prevalências de infecção em vitelos encontradas noutros países do Continente Americano e da Europa. Na República Checa Kvác et al. (2006) obtiveram uma prevalência de 25,8% em vitelos antes e depois do desmame e a prevalência nas explorações leiteiras variou entre 1,4% e 56,5%. Em Espanha (Galiza) Castro-Hermida et al. (2002a) obtiveram uma prevalência de 47,9% em vitelos com menos de 3 semanas de idade e Brook et al. (2008) conseguiram uma prevalência de 28% em vitelos antes do desmame em Inglaterra. Nos EUA Santin et al. (2004) obteve uma prevalência de 50% em vitelos por desmamar e 20% em vitelos após o desmame. No Canadá foram encontradas prevalências de 30% em vitelos amostrados uma única vez (Trotz-Williams et al., 2008) e

78% em vitelos amostrados durante 4 semanas em explorações seleccionadas devido a história de diarreia neonatal (Trotz-Williams et al., 2007).

A prevalência de rebanho encontrada neste estudo (pelo menos um animal positivo detectado na exploração) foi de 54,9%, com as explorações positivas distribuídas por toda a ilha. Este valor vai também ao encontro dos valores obtidos em outros estudos realizados por todo o mundo. Martins (2013) obteve uma prevalência de 43% no estudo realizado na ilha de S. Miguel, Açores (valor inferior ao do presente estudo). De acordo com Madeira de Carvalho et al. (2011) num estudo realizado no noroeste de Portugal continental 100% das explorações possuíam vitelos infectados, no entanto todas as explorações possuíam história de diarreia em vitelos. Nos EUA Garber et al. (1994) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 59,1% das explorações estudadas e no Canadá foi obtida uma prevalência de 77% (Trotz-Williams et al., 2008).

No entanto as comparações devem ser ajustadas a diversos factores, como a idade da população em estudo, se a população está limitada a vitelos diarreicos ou não diarreicos, se o estudo inclui uma amostra única por animal ou amostras colhidas ao longo do tempo e/ou a sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico utilizado.

O presente trabalho apesar de ter sido conduzido em animais de uma categoria de elevado risco, o único critério de selecção das explorações foi a colaboração dos produtores e a presença de vitelos na altura da visita à exploração. De acordo com Fayer et al. (1998b) a prevalência da criptosporidiose bovina é muitas vezes subestimada devido ao baixo número de amostras colhidas durante o período pré-desmame. O autor considera que a prevalência real possa ser superior à prevalência encontrada (31,2%), uma vez que este valor é o resultado do exame directo de uma única amostra por vitelo colhida num determinado tempo, que poderá ter sido na fase inicial da infecção ou na fase de recuperação em que a excreção de oocistos é menor. É também sabido que a excreção de oocistos pelos vitelos infectados pode ser intermitente.

Em relação ao teste de diagnóstico utilizado o método do esfregaço fecal directo com coloração de ZN modificada não é tão sensível como as técnicas moleculares apresentando a desvantagem de falha na detecção de casos positivos no caso de infecções pouco graves. No entanto, é muito económico e fácil de realizar permitindo a coloração simultânea de vários esfregaços ao mesmo tempo e uma boa visualização da morfologia dos oocistos (Pereira da Fonseca, 2000).

A sensibilidade do teste utilizado em adição a amostras pequenas reduzem a probabilidade de detectar um animal positivo, particularmente quando a prevalência dentro da exploração é baixa. No entanto alguns autores concluíram que amostras pequenas podem ser suficientes

para determinar a prevalência de um rebanho e que encontrar oocistos num vitelo indica “uma infecção recente, uma infecção em curso ou uma infecção esperada” em todos os vitelos até 30 dias de idade (McCluskey et al, 1995).

No que diz respeito à idade dos animais, a Criptosporidiose afecta principalmente vitelos entre a primeira e a quarta semana de vida (O’Handley et al., 1999). E tem sido reportado que vitelos sobretudo de explorações leiteiras, especialmente os que possuem menos de um mês de idade são normalmente infectados por *Cryptosporidium* sp. (De Graaf et al., 1999). Estas afirmações confirmam-se no presente estudo, constituindo a idade um factor de risco. Os vitelos com idade entre os oito e quinze dias de idade mostraram a prevalência mais elevada (54,1%) seguida dos animais entre um e sete dias de idade (42,9%) e os animais entre 16 e 21 dias (35,3%). Estes resultados estão de acordo com os resultados publicados por vários autores em vitelos na segunda semana de vida (De la Fuente et al., 1999; Feitosa et al., 2004; Santin et al., 2004; Kvac et al., 2006; Trotz-Williams et al., 2007; Santin et al., 2008; Brook et al., 2008) e em vitelos na primeira semana de vida (Del Cocco et al., 2008; Tiranti et al., 2011). A partir da segunda semana de vida as prevalências diminuíram com o aumentar da idade, tendo os animais com idade superior ou igual a trinta dias obtido o menor número de animais positivos (13%), o que seria de esperar pois de acordo com vários autores o risco de infecção diminui significativamente com o aumento da idade dos animais (Maldonado-Camargo, Atwill, Saltijeral-Oaxaca e Herrera-Alonso, 1998; Mahommed et al., 1999).

Estes valores são consistentes com a hipótese de que os vitelos podem contrair a infecção imediatamente após o nascimento. Os vitelos podem tornar-se infectados através da mãe após o parto ou através dos locais de alojamento ou contenção utilizados anteriormente por outros vitelos, o que nos indica uma elevada contaminação ambiental destes locais.

Como já foi mencionado neste trabalho o principal sintoma da criptosporidiose é a diarreia. Dos 250 vitelos examinados, 101 tinham fezes diarreicas (41%) e como seria de esperar a maior percentagem de positivos foi encontrada nos animais com diarreia (53,5%). Das restantes fezes diarreicas 46,5% foram negativas a *Cryptosporidium* sp. o que sugere a presença de outros agentes enteropatogénicos que surgem nesta idade e que podem ser causa de diarreia (De la Fuente et al., 1999; Naciri et al., 1999).

Das fezes com consistência normal 16, 1% também foram positivas à presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. o que pode comprovar o papel de alguns animais como portadores assintomáticos da doença, o facto da diarreia poder ser intermitente e à medida que a infecção se resolve menor é a excreção de oocistos. O papel destes vitelos não deve ser esquecido uma vez que actuam como portadores e como foco de infecção para outros animais, possuindo potencial zoonótico.

Ainda neste estudo foi nas fezes diarreicas que se observou a maior percentagem (46,3%) de amostras com nível de infecção mais elevado (nível IV). O nível de infecção IV foi o segundo mais observado representando 32% do total de amostras positivas e surgiu principalmente nos animais entre os 8 e os 15 dias de idade, o que confirma mais uma vez a importância desses animais como fonte de transmissão e contaminação do meio envolvente.

Também durante este estudo foram avaliados vários factores relacionados com o manejo das explorações que poderiam estar associados à presença de *Cryptosporidium* sp.

Segundo Trotz-Williams et al. (2007) a permanência de vitelos leiteiros com as mães por mais de uma hora após o parto aumenta o risco de infecção por *Cryptosporidium* em relação aos animais que são separados da mãe em uma hora após o nascimento. De acordo com Quigley et al. (1994) e Mohammed et al. (1999) a separação dos vitelos das mães em poucas horas e a alimentação manual diminui o risco de infecção. Por outro lado deixar os vitelos com a mãe parece ter efeito protector devido à toma contínua de anticorpos maternos nos primeiros dias de idade (Duranti et al., 2009). Neste estudo a maioria das explorações (n=48) separaram os vitelos das mães imediatamente após o nascimento ou na manhã seguinte se o parto ocorrer durante a noite e alimentam os vitelos manualmente com colostro de várias vacas.

No presente estudo não se observou diferença significativa na prevalência de *Cryptosporidium* entre explorações que mantêm vitelos em instalações colectivas ou individuais, no exterior ou no interior. Maddox-Hyttel et al. (2006) e Castro-Hermida et al. (2002a) também não observaram diferença significativa entre vitelos jovens mantidos em grupo ou de forma individual. De acordo com Castro-Hermida et al. (2002a) o tipo de alojamento exterior ou interior também não teve nenhum efeito no risco de infecção por *Cryptosporidium*. No entanto é sabido que a sobrelotação de animais em locais confinados aumenta o risco de infecção por permitir que animais saudáveis entrem em contacto com animais que actuam como reservatório da doença.

No que diz respeito ao tipo de piso vários autores reportaram diferentes resultados. De acordo com Júnior et al. (2011) o piso de pasto pode constituir um factor de risco pois é capaz de reter a humidade do solo e consequentemente prolongar a viabilidade dos oocistos no ambiente. Segundo Mohammed et al. (1999) o chão de cimento nas instalações está associado a um menor risco de infecção enquanto o chão de palha, terra ou piso de areia estão associados a um maior risco de infecção (Castro-Hermida et al.; 2002a; Muhid et al., 2011).

Segundo MacAllister et al. (2005) condições precárias de higiene e limpeza das instalações contribuem de forma decisiva para a exposição e consequente infecção dos vitelos. Explorações com boas práticas de higiene e que adoptam vazio sanitário nas instalações apresentam uma menor contaminação ambiental por oocistos (Hamnes et al., 2006). De

acordo com Castro-Hermida et al. (2002a) o risco de infecção tende a diminuir quando os animais são alojados em instalações previamente desinfetadas com lixívia ou cal, um menor risco está também associado ao chão de cimento lavado diariamente com água sob pressão.

No presente estudo 35 explorações (69%) mantinham os vitelos ao ar livre nomeadamente na pastagem. Das explorações com instalações interiores 14 utilizavam palha/aparas de madeira como material das camas e destas apenas 2 explorações possuíam piso de cimento, o mais fácil de higienizar. O piso em madeira foi o mais encontrado (n=6), sendo no entanto o mais difícil de lavar.

Das 16 explorações apenas 6 realizavam uma higienização adequada com mudança do material da cama, lavagem e desinfecção com lixívia, no entanto a frequência com que estas práticas eram realizadas não foi averiguada pelo questionário. De acordo com Mohammed et al. (1999) a adição diária de material de cama limpo e a retirada do material conspurcado também tem efeito protector. Tendo em conta a elevada concentração de oocistos que podem ser excretados por vitelos infectados as instalações com pobres condições de higiene deveriam ser uma significativa fonte de oocistos para os vitelos recém-nascidos, no entanto, nenhum dos factores de higiene ou alojamento mostraram ter efeito significativo na presença de infecção por *Cryptosporidium* sp.

O factor mais importante que contribui para a qualidade do colostro e que pode realmente ser influenciado pelo produtor é o intervalo entre o parto e a primeira ordenha. Para um colostro de elevada qualidade as vacas devem ser ordenhadas imediatamente ou o mais cedo possível após o parto (Lorenz, 2009). A qualidade do colostro diminui rapidamente após o nascimento do vitelo, assim como a capacidade de absorção das imunoglobulinas que lhe irão conferir imunidade. É recomendado alimentar um total de quatro litros de colostro nas primeiras seis a doze horas de vida. Das explorações envolvidas neste estudo apenas 9 (18%) afirmaram fornecer o colostro após as 12 horas de vida. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre explorações que fornecem o colostro antes das 6-12 horas de vida ou após as 12 horas de vida. Os oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis na água por um longo período de tempo (Ramirez, Ward e Sreevatsan, 2004). O fornecimento de água não tratada aos animais pode ser considerado um factor de risco uma vez que a água e o alimento contaminados são também vias de infecção. Neste estudo 43% das explorações forneciam aos vitelos água proveniente de tanques ou lagoas. A aplicação de estrume para fertilização dos terrenos agrícolas é prática comum na ilha Terceira o que poderá levar à contaminação de fontes de água que é muitas vezes utilizada nas instalações e no abeberamento dos animais. Na ilha Terceira um estudo realizado por Cabral (2001) em 48 amostras de águas de consumo não

apresentou qualquer resultado positivo à presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp., no entanto não se conhecem estudos realizados em águas superficiais ou subterrâneas nesta ilha. Também o sistema de abeberamento pode constituir risco de infecção, os bebedouros e baldes colocados no chão são mais facilmente conspurcados por fezes aumentando o risco de infecção. Apenas 26% das explorações estudadas utilizavam baldes individuais suspensos.

A localização das explorações também constituiu factor de estudo neste trabalho. A determinação da altitude e declive do terreno em que se localizam os vitelos foi efectuada de forma a perceber se constituíam factor de risco. O transporte de oocistos através dos solos e a escorrência das águas das pastagens são duas potenciais rotas de contaminação. A escorrência da água das pastagens pode ser importante nas explorações que mantêm os vitelos no pasto quando as chuvas intensas excedem a capacidade de absorção dos solos, criando dificuldades de escoamento e transportando oocistos no sentido das pastagens mais baixas. Por outro lado, as pastagens situadas a maior altitude possuem durante todo o ano condições de humidade e pluviosidade que podem contribuir para a manutenção viável dos oocistos nas pastagens. Apesar destes factores a comparação das médias de altitude e declive das explorações não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$).

A falta de representatividade do tamanho da amostra ($n=51$) poderá explicar o facto de nenhuma das variáveis obtidas por questionário ter tido um efeito significativo no desencadear da doença ($p>0,05$).

A dinâmica da infecção por *Cryptosporidium* sp. atinge o seu pico por volta da primeira ou segunda semanas de vida e a duração da excreção de oocistos dura uma a duas semanas. De acordo com Maldonado-Camargo et al. (1998) o risco de excreção de oocistos é máximo aos 15 dias de idade. De uma forma geral os resultados obtidos nos grupos etários até aos 21 dias sublinham a importância e o papel destes animais na manutenção da infecção nas explorações e o elevado risco zoonótico que representam. A identificação de vitelos infectados é um passo preliminar para controlar esta zoonose mundialmente difundida. Este estudo sugere fortemente que os vitelos até aos 21 dias de idade são uma importante fonte de infecção para os recém-nascidos e a principal fonte de contaminação do meio ambiente.

Nas explorações leiteiras os vitelos nascem continuamente durante todo o ano, o mesmo acontece nas explorações da ilha Terceira. Devido à resistência dos oocistos de *Cryptosporidium* no meio ambiente e à contínua introdução de novos vitelos susceptíveis, o processo de transmissão torna-se contínuo nestas explorações (Kvac et al., 2006). Medidas de controlo e prevenção da infecção devem ser consideradas e a estratégia de intervenção deve ter como principal alvo os animais destas faixas etárias.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar da amostragem por conveniência não probabilística não ter permitido um estudo de prevalência mais apurado, uma vez que a amostra não é representativa da população, o principal objectivo deste estudo foi atingido, ficando desta forma registado que a infecção por *Cryptosporidium* sp. está presente em 31,2% dos vitelos até aos 60 dias de idade nas explorações leiteiras da ilha Terceira.

Este estudo sugere fortemente que os vitelos até aos 21 dias de idade, do ponto de vista epidemiológico, são uma importante fonte de infecção para os recém-nascidos e uma potencial fonte de contaminação ambiental, devido às elevadas taxas de excreção de oocistos. Também os animais portadores assintomáticos possuem elevada importância na disseminação da infecção. O risco zoonótico destes animais também não deve ser negligenciado. Apesar do método de diagnóstico utilizado não permitir a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* sabe-se que os vitelos nestas idades excretam principalmente oocistos de *C. parvum*, a espécie com maior potencial zoonótico.

Uma vez que não há tratamento efectivo para a criptosporidiose bovina esta continua a ser um desafio para os médicos veterinários. A prevenção e o controlo passam por conhecer a importância e a epidemiologia da doença, o papel do médico veterinário vai além do tratamento da doença, sendo o diálogo no sentido do aconselhamento dos produtores um ponto importante, de forma a transmitir mensagens de correcção de práticas de manejo que possam constituir factores de risco para a transmissão desta e outras doenças infecciosas entre os animais e destes para o Homem.

Ao longo deste estudo pôde constatar-se a falta de conhecimento desta doença por parte dos produtores e tratadores e também a falta de condições e práticas higio-sanitárias que muitas explorações ainda carecem, principalmente no que diz respeito ao manejo dos vitelos. A implementação de medidas de controlo que se adaptem à realidade vigente deve ser imediata em algumas explorações tais como: o fornecimento adequado de colostro, a separação dos vitelos com sinais clínicos de doença, a separação dos vitelos dos animais adultos e principalmente a frequente limpeza e desinfecção dos utensílios utilizados no dia-a-dia e das instalações. Uma vez que os sinais clínicos associados à infecção por *Cryptosporidium* são na sua maioria não específicos este é muitas vezes subdiagnosticado. O diagnóstico etiológico da doença é também um factor importante que permite a diminuição dos custos em tratamentos ineficazes no que diz respeito a esta parasitose. Só desta forma se poderá minimizar o impacto clínico e económico na produção.

A produção de gado nomeadamente a produção leiteira é uma das actividades económicas mais importantes na ilha Terceira e no restante arquipélago dos Açores que tem vindo a evoluir ao longo dos anos tanto na formação dos produtores como na introdução das novas tecnologias. O presente estudo consiste em mais um contributo à saúde animal, à redução de custos no sector da pecuária e à protecção da saúde pública. Neste âmbito o Laboratório Regional de Veterinária dos Açores é uma entidade oficial que está ao dispor de médicos veterinários e produtores no auxílio ao diagnóstico não só da criptosporidiose mas também de outras parasitoses e doenças infecciosas.

Vários estudos poderão ser ainda realizados no âmbito da criptosporidiose bovina na ilha Terceira, pois como já foi referido este estudo apenas representa um contributo que pode e deve ser complementado com outros trabalhos nesta área.

- i) A utilização de uma amostra mais representativa do efectivo bovino da ilha Terceira seria importante, assim como um estudo longitudinal com a colheita de várias amostras ao longo do tempo que avalie a verdadeira prevalência da infecção por *Cryptosporidium*.
- ii) A identificação através das técnicas moleculares das espécies de *Cryptosporidium*, que por motivos económicos não foi possível realizar neste estudo, pois seria interessante do ponto de visto epidemiológico avaliar o verdadeiro risco zoonótico que esta parasitose representa.
- iii) A avaliação do potencial risco de transmissão da criptosporidiose pela água através da pesquisa de oocistos em amostras provenientes de fontes de água não tratadas como charcos, lagoas e/ou tanques muitas vezes utilizadas nas práticas diárias das explorações inclusive no abeberamento dos animais.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsen, M.S. (1998). Bovine T cell responses to *Cryptosporidium parvum* infection. *Int J Parasitol*, 28, 1083-8.
- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V. (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304, 441-445.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F. (2003). Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2744-2747.
- Alves, M.M. (2006). *Caracterização epidemiológica da criptosporidiose em Portugal, por estudo molecular de isolados de Cryptosporidium spp de humanos e de animais*. Dissertação de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Lisboa: IHMT
- Anderson, B.C. (1987). Abomasal Cryptosporidiosis in Cattle. *Vet. Pathol*, 24, 235-238.
- Atwill, E.R., Harp, J.A., Jones, T., Jardon, P.W., Checél, S., Zylstra, M. (1998). Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calfhood infection. *Am. J. Vet. Res*, 59, 1116-1121.
- Atwill, E.R., Johnson, E., Klingborg, D.J., Vesperat, G.M., Markegard, G., Jensen, W.A., Pratt, D.W., Delmas, R.E., George, H.A., Forero, L.C., Philips, R.L., Barry, S.J., McDougald, N.K., Gildersleeve, R.R., Frost, W.E. (1999a). Age, geographic, and temporal distribution of faecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *Am. J. Vet. Res*, 60, 420-425.
- Atwill, E.R., Johnson, E.M., Pereira, M.G. (1999b). Association of herd composition, stocking rate, and duration of calving season with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds. *J Am Vet Med Assoc*, 215, 1833-1838
- Atwill, E.R., Pereira, M.G. (2003). Lack of detectable shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts by periparturient dairy cattle. *J Parasitol*, 89, 1234-1236.
- Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E., Bryant, R.B. (2003). Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms. *J. Dairy Sci*, 86, 784-791.
- Bouzig, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M. (2013). *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 115-134.
- Brook, E., Hart C.A., French N., Christley, R. (2008). Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, 152, 46-52.
- Cabral, C.P.L.S. (2001). *Giardia lamblia e Cryptosporidium parvum nas águas de consumo da ilha Terceira*. Relatório de estágio em Engenharia do Ambiente. Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores - Departamento de Ciências Agrárias.

- Caccio S.M. (2004). New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parassitologia*, 46(1-2), 151-155.
- Caccio S., Thompson, A., McLauchlin, J., Smith, H.V. (2005). Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*, 21, 430-437.
- Cardoso, J.M.G. (2010). *Contribuição para o estudo do parasitismo gastrointestinal e hepático em bovinos de carne em regime extensivo no Concelho de Odemira*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Universidade de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.
- Casemore, D.P. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*. 44, 445-451
- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A., Ares-Mazás, E. (2002a). Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 106, 1-10.
- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A., Mezo-Menéndez, M., Ares-Mazás, E. (2002b). A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 106, 11-17
- Chen, X.M., Keithley, J.S., Paya, C.V., LaRusso, N.F. (2002). Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*, 346, 1723-31.
- Clavel, A., Doiz, O., Morales, S., Varea, M., Seral, C., Castillo, F.X., Fleta, J., Rubio, C., Gomez-Lus, R. (2002). House fly, *Musca domestica*: as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol*. 49, 163–164.
- Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplex, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool*. 33, 289–296.
- Del Cocco, V.F., Córdoba, M.A., Basualdo, J.A. (2008). *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 158, 31-35
- Del Cocco, V.F., Córdoba, M.A., Basualdo, J.A. (2009). Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiologia*, 41, 185-196.
- De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*, 29, 1269-1287.
- De la Fuente, R., Luzón, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., Orden, J.A., Garcia, S., Sanz, R., Gómez-Bautista, M. (1999) *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol*, 80(2), 179-185.
- Duranti, A., Caccio, S.M., Pozio, E., Di Egidio, A., De Curtis, M., Battisti, A., Scaramozzino, P. (2009). Risk Factors Associated with *Cryptosporidium parvum* Infection in Cattle. *Zoonoses Public Health*, 56, 176-182

- DuPont, H., Chappell, C., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakobowski, W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332, 855–859.
- Elitok, B., Elitok, O.M., Pulat, H. (2005). Efficacy of azithromycin dihydrate in treatment of cryptosporidiosis in naturally infected dairy calves. *J Vet Intern Med*, 19, 590-593.
- Enemark, H.L., Ahrens, P., Bille-Hansen, V., Heegaard, P.M., Vigre, H., Thamsborg, S.M., Lind, P. (2003). *Cryptosporidium parvum*, infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. *Parasitology* 126, 407–416
- Esteban, E., Anderson, B.C. (1995). *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy Sci.* 78, 1068–1072.
- Faubert, G.M., Litvinsky, Y. (2000). Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *J Parasitol*, 86, 495-500.
- Fayer, R., Leek, R.G. (1984). The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *J Protozool*, 31, 567-569.
- Fayer, R., Ungar, B.L.P. (1986). *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50 (4), 458-483.
- Fayer, R., Ellis, W. (1993). Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *J. Parasitol*, 79, 771–774.
- Fayer, R., Trout, J.M., Jenkins, M.C. (1998a). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84, 1165–1169.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P. (1998b). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: Dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int. J. Parasitol*, 28, 49-56.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. (2000a). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*, 30, 1305-1322.
- Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K., Lewis, E.J. (2000b). Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on 3 Maryland farms. *Vet. Parasitol.* 93, 103–112
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 126, 37-56.
- Fayer, R., Santin, M., Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol*, 91, 624-629.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol*, 135, 105-112.

- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, 145, 260-266.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156, 191-198
- Fayer, R. (2008). General Biology. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed.) (pp. 1-42). NW: CRC Press.
- Fayer, R., Santin, M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164, 192-200
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124, 90-97
- Feitosa, F.L.F., Shimamura, G.M., Roberto, T., Mendes, L.C.N., Peiró, J.R., Féres, F.C., Bovino, F., Perri, S.H.V., Meireles, M.V. (2004). Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarréia em bezerros. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10), 452-456
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* 144, 1-9.
- Foster, D.M., Smith, G.W. (2009). Pathophysiology of Diarrhea in Calves. Review Article. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 25, 13-36.
- Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J.L. (1994). Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc*, 205, 86-91
- Gardiner, C.H., Fayer, R., Dubey, J.P. (1998). *An Atlas of protozoan Parasites in Animal Tissues*. (2nd ed.). Washington DC. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. pp. 38-39
- Goh, S., Reacher, M., Casemore, D.P., Verlander, N.Q., Chalmers, R., Knowles, M., Williams, J., Osborn, K., Richards, S. (2004). Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 1007-1015
- Gookin, J.L., Nordone, S.K., Argenzio, A. (2002). Host Responses to *Cryptosporidium* Infection, *J Vet Intern Med*, 16, 12-21
- Hamnes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L. (2006). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet. Parasitol.* 140, 204-216.
- Harp J. (2003). *Cryptosporidium* and host resistance: historical perspective and some novel approaches. *Anim Health Res Rev*, 4, 53-62.
- Harp, J.A., Goff, J.P. (1998). Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *J Dairy Sci*, 81, 289-294
- Harp, J.A., Woodmansee, D.B., Moon, H.W. (1990). Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infect Immun*, 58, 2237-2240

- Huetink, R.E., van der Giessen, J.W., Noordhuizen, J.P., Ploeger, H.W. (2001). Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol*, 102, 53-67
- Hunter, P.R., Thompson, R.C.A. (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 35, 1181–1190
- Iseki, M. (1979). *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 28, 285–307.
- Joachim, A. (2004). Human Cryptosporidiosis: An Update With Special Emphasis on the Situation in Europe. *J. Vet. Med.* B 51, 251–259.
- Júnior, F.A.S., Carvalho, A.H.O., Rocha, C.M.B.M., Guimarães, A.M. (2011). Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.* 31(8), 690-696.
- Koehler, A.V., Whipp, M.J., Haydon, S.R., Gasser, R.B. (2014). *Cryptosporidium cuniculus* - new records in human and kangaroo in Australia. *Parasites & Vectors*, 7, 492.
- Kvac, M., Vítovec, J. (2003). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med.* B 5, 451–457
- Kvac, M., Kouba, M., Vitovec, J. (2006). Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet Parasitol*, 137, 202-209.
- Kvac, M., Kestranova, M., Pinkova, M., Kvetonova, D., Kalinova, J., Wagnerova, P., Kotkova, M., Vitovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B. (2013). *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 191, 218– 227
- Lallemand, M., Villeneuve, A., Belda, J., Dubreuil, P. (2006). Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinat in the treatment of cryptosporidiosis in veal calves. *Vet. Rec.* 159, 672–676
- Larson, L.L., Owen, F.G., Abright, J.L., Appeman, R.D., Lamb, R.C., Muller, L.D. (1977). Guidelines toward more niformity in measuring and reporting calf experimental data. *J. Dairy Sci.* 60, 989–992.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R. (2001). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Vet. Rec.* 148, 108–112.
- Levine, N.D. (1984). Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J Protozool*, 31, 94-98.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 91–95.

- Lobo, M.L., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. (2009). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 732–737
- Lorenz, I. (2009). An update on calf diarrhoea – Part 2: Prevention. *Irish Veterinary Journal*, 62(2), 130-133.
- MacKenzie, V.R., Schell, W.L., Blair, K.A. (1994). Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis.*, 21, 57-62
- Maddox-Hyttel, C., Langkjær, R.B., Enemark, H., Vigre, H. (2006). *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pig - occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol*, 141, 48–59
- Madeira de Carvalho, L.M., Martins, S., Sousa, S., Bacelar, J., Cannas da Silva, J. (2011). *Cryptosporidium* spp. as a major agent of calf diarrhea: Epidemiology and Control with Halofuginone Lactate in Portugal [Editado em polaco]. *Lecznica Duzych Zwierząt*, 2, 35-41 Comunicação Oral a convite do Prof. Doutor Dariusz Bednarek e Dr. Marek Branicki. *VII Konf. Bujatryczna w Puławach (VII Congresso de Buiatria da Polónia)*, Polish National Veterinary Research Institute, Pulawy, 15-16 de Abril 2011
- Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Herrera-Alonso, L.C. (1998). Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. *Prevent Vet Med*, 36, 95-107.
- Martins, R.L., (2013). *Eimeriose e Cryptosporidiose em vitelos de explorações leiteiras da ilha de S. Miguel (Açores)*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Coimbra: Escola Universitária Vasco da Gama.
- Martins, S., Sousa, S., Madeira de Carvalho, L.M., Bacelar, J., Cannas da Silva, J. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Northwest Portugal Dairy Calves and Efficacy of Halofuginone Lactate on the Prevention of Cryptosporidiosis. *Cattle Practice*, 15, Part 2, 152-156
- McAllister, T.A., Olson, M.E., Fletch, A., Wetzstein, M., Entz, T. (2005). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *Can. Vet. J.* 46, 47–55.
- McCluskey, B.J., Greiner, E.C., Donovan, G.A. (1995). Patterns of *Cryptosporidium* oocyst shedding in calves and a comparison of two diagnostic methods. *Veterinary Parasitology*, 60(3-4), 185-190
- Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J.M., Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol*, 147, 47-50.
- Mohammed, H.O., Wade, S.E., Schaaf, S. (1999). Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol*, 83, 1-13.

- Moore, D.A., Atwill, E.R., Kirk, J.H., Brahmbhatt, D., Herrera Alonso, L., Hou, L., Singer, M.D., Miller, T.D. (2003). Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *J Am Vet Med Assoc*, 223, 839-845.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Hill, B.D., O'Donoghue, P., Limor, J., Lal, A.A., Thompson, R.C.A. (2000). Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (Dugong dugong). *J. Parasitol*, 86, 1352–1354.
- Muhid, A., Robertson, I., Ng, J., Ryan, U. (2011). Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. *Experimental Parasitology*, 127 (2), 534-538.
- Naciri M., Lefay, M.P., Mancassola, R., Poirier, P., Chermette, R. (1999). Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet Parasitol*, 85, 245-257
- Nasir, A., Avais, M., Khan, M.S, Khan, J.A., Hameed, S., Reichel, M.P. (2013). Treating *Cryptosporidium parvum* Infection in Calves. *J. Parasitol.*, 99(4), 715–717
- Nydam, D., Peregrine, A.S. (2005). Present and Future Control of Cryptosporidiosis in Cattle. *The AABP Proceedings*, Vol. 38, 15-18
- Office International des Épizooties (2008). *OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.9.4. – Cryptosporidiosis, 2008*, 1192-1215
- O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E. (1999). Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*, 214, 391-396.
- O'Handley, R.M., Olson, M.E. (2006). Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. *Vet Clin Of North Amer: Food Animal Pratices*, 22(3), 623-643
- O'Hara, S.P., Chen, X. (2011). The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect.*, 13(8-9), 721–730
- Ollivett. T.L., Nydam, D.V., Bwman, D.D., Zambriski, J.A., Bellosa, M.L., Lnden, T.C., Divers, T.J. (2009). Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.*, 92(4), 1643-8.
- Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitol*, 20, 185-191.
- Panciera R.J., Thomassen R.W., Garner F.M. (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol*, 8, 470-479.
- Pereira da Fonseca, I.M.S. (2000). *Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: Caracterização genética de isolados de Cryptosporidium parvum de origem bovina*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

- Pereira da Fonseca, I.M.S., Cannas da Silva, J. (2000). Bovine Cryptosporidiosis: epidemiological study in Portugal. *Proceedings XXI Congresso Mundial de Buiatria, Punta del Este, Uruguai, 4-8 Dez, 2000*.
- Perryman, L.E., Kapil, S.J., Jones, M.L., Hunt, E.L. (1999). Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 17, 2142-2149.
- Programa Informático de Saúde Animal (PISAAçores) (2014). Acedido em Out. 20, 2014.
- Quigley, J.D., Martin, K.R., Bemis, D.A., Potgieter, L.N., Reinemeyer, C.R., Rohrbach, B.W., Dowlen, H.H., Lamar, K.C. (1994). Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. *J Dairy Sci*, 77, 3124-3131.
- Ralston, B.J., McAllister, A., Olson, M.E. (2003) Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet. Parasitol.* 114, 113–122.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of Cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6, 773-785.
- Rider, S.D., Zhu, G. (2010). *Cryptosporidium*: Genomic and Biochemical Features. *Exp Parasitol.*, 124(1), 1-12
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3494–3500.
- Rossle, N.F., Latif, B. (2013). Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(11), 916-924.
- Sanford, S.A., Josephson, G.K.A. (1982). Bovine Cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in fourty-two scouring neonatl calves. *Can Vet. J.*, 23, 340-343
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol*, 122, 103-117.
- Santin, M., Trout, J.M. (2008). Livestock. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed.) (pp. 451-483). NW: CRC Press.
- Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155, 15-23.
- Santín, M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 1–10
- Serviço Regional de Estatística dos Açores (SREA) (2014). Acedido em Out. 20, 2014, em <http://estatistica.azores.gov.pt/>

- Shahiduzzaman, M., Daugschies, A. (2012). Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Vet Parasitol*, 188, 203-214
- Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol*, 65, 262-6.
- Smith, H. (2008). Diagnostics. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed.) (pp. 173-207). NW: CRC Press.
- Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol*, 149, 29-40
- Thompson, R.C.A., Palmer, C.S., O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 177, 18–25
- Tiranti, K., Larriestra, A., Vissio, C., Picco, N., Alustiza, F., Degioanni, A., Vivas, A. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 20(2), 140-147
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E., Peregrine, A.S. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J*, 46, 349-351.
- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. (2007). Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 82, 12–28.
- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. (2008). Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Preventive Veterinary Medicine*, 83(1), 11-23.
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Peregrine, A.S., Duffield, T.F., Leslie, K.E. (2011). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *Vet. Rec.*, 168(19), 509
- Tzipori S., Campbell, I., Sherwood, D., Snodgrass, D.R., Whitelaw, A. (1980). An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *Vet Rec.* 107, 579-580.
- Tzipori, S., Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4, 1047–1058
- Wang, H.F., Swain, J.B., Besser, T.E. (2003). Detection of antibodies to a recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 in serum and feces from neonatal calves. *J Parasitol*, 89, 918-23.
- Wyatt, C.R., Riggs, M.W., Fayer, R. (2010). Cryptosporidiosis in Neonatal Calves. *Vet Clin Food Anim*, 26, 89-103
- Xiao, L., Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52, 309–323.

- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*, 17, 72-97.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431, 1107–1112.
- Zhu, G. (2008). Biochemistry. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed.) (pp. 57-118). NW: CRC Press.

ANEXOS

ANEXO 1 - Questionário

Produtor:

Código de exploração:

Freguesia:

Data:

Local de nascimento dos vitelos?

Tempo decorrido entre o parto e a separação dos vitelos da mãe?

Fornecimento de colostro?

Tipo de alojamento ou contenção dos vitelos?

Tipo de piso dos alojamentos?

Como faz a higiene das instalações?

Origem da água de abeberamento?

Como é feito o abeberamento dos vitelos?

Há história de diarreias neo-natais?

Realiza vacinações na exploração?

ANEXO 2 – Localização das explorações

